Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. F. Doenecke

Säulenchromatographische Fraktionierung des „Uropepsinogens"

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von

Hermann Theiß

1969

Dekan: Prof. Dr. med. H. Witter
I. Referent: Priv.-Doz. Dr. W. Leppla
II. Referent: Prof. Dr. F. Doenecke

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. F. Doenecke

Säulenchromatographische Fraktionierung des „Uropepsinogens"

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von

Hermann Theiß

Dekan: Prof. Dr. med. H. Witter
I. Referent: Priv.-Doz. Dr. W. Leppla
II. Referent: Prof. Dr. F. Doenecke

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 6. Februar 1969 abgelegt.

Meinen Eltern gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. Einleitung

A Historischer Überblick ..... S. 4

B Die Heterogenität von Pepsin und Pepsinogen .. S. 8

C Die Ionenaustausch-Chromatographie von Proteinen ..... S. 10

D Die Ionenaustausch-Chromatographie von Pepsin und Pepsinogen ..... S. 18

II. Darstellung und Analyse der bisher publizierten säulenchromatographischen Untersuchungen des Pepsins und Pepsinogens

A Säulenchromatographische Untersuchung des Schweinepepsins und -pepsinogens ..... S. 21

B Säulenchromatographische Untersuchungen des menschlichen Pepsins und Pepsinogens ..... S. 31

C Zusammenfassung der Ergebnisse der bisher publizierten elutionschromatographischen Analysen des Pepsins und Pepsinogens ..... S. 53

III. Problemstellung ..... S. 56

IV. Eigene Untersuchungen ..... S. 59

A Methodischer Teil ..... S. 60

B Ergebnisse ..... S. 76

V. Zusammenfassung der Versuchsergebnisse ..... S. 113

VI. Diskussion ..... S. 117

VII. Anhang ..... S. 123

VIII. Zusammenfassung ..... S. 129

IX. Literaturverzeichnis ..... S. 131

I. EINLEITUNG

A Historischer Überblick

Im menschlichen Harn befindet sich die bisher als Uropepsinogen bezeichnete inaktive Vorstufe einer sauren proteolytischen Enzymaktivität. Das Vorhandensein eines eiweißspaltenden Enzyms im Harn wurde zum ersten Mal 1861 von v. BRÜCKE (8) beschrieben. Er nahm an, daß diese Enzymaktivität durch renale Ausscheidung von im Magen-Darmtrakt reabsorbiertem Pepsin verursacht sei. Nachdem 1881 LANGLEY die Vorstufe des Pepsins, das Pepsinogen in der Magenmucosa nachgewiesen hatte, vermutete 1886 GEHRIG (12), daß die saure proteolytische Enzymaktivität des Harnes durch Pepsinogen und nicht durch Pepsin bedingt sei. Diese Annahme wurde in den folgenden Jahren durch die Untersuchungen mehrerer Autoren bestätigt: FALK und KOLIEB (11) fanden auch im Bikarbonat-alkalischen Harn eine peptische Aktivität. Da aber Pepsin bereits im schwach alkalischen Milieu zerstört wird, konnte die saure proteolytische Enzymaktivität des Harnes nur durch Aktivierung des alkalistabileren Pepsinogens bedingt sein. Gegen die P e p s i n-Reabsorptionshypothese von v. BRÜCKE sprachen die Untersuchungsergebnisse PECHSTEIN's, der nach oraler Applikation von P e p s i n keine Zunahme der proteolytischen

Enzymaktivität des Harnes feststellen konnte (23). MIRSKY und Mitarbeiter fanden nach intravenöser Injektion von Pepsinogen beim Hund eine deutliche und der injizierten Menge entsprechende Zunahme der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes (20). Dagegen blieb diese unverändert nach intravenöser Verabreichung von Pepsin, da dieses bei der Wasserstoffionenkonzentration des Blutes schnell inaktiviert wird (NORTHROP u.Mitarb. (22)).

BENDERSKY (5) nannte die im sauren pH-Bereich wirksame proteolytische Aktivität des Harnes Uropepsin. Diese Bezeichnung ist in der angelsächsischen Literatur heute noch im Gebrauch. Im deutschen Schrifttum bevorzugt man dagegen die Bezeichnung "Uropepsinogen" und berücksichtigt so die Annahme einer im Harn ausgeschiedenen Enzymvorstufe.

Als Quelle des "Uropepsinogens" werden die Pepsin-produzierenden Zellen der Magenschleimhaut angesehen, da beim Hund und bei der Ratte nach Gastrektomie kein "Uropepsinogen" mehr nachweisbar war (van CALCKAR (9), BALFOUR u.Mitarb. (4)). Auch bei einigen Patienten nahm nach subtotaler Magenresektion die "Uropepsinogen"-Ausscheidung ab (AITKEN u.Mitarb. (1), GRAY u.Mitarb. (13)).

Man nimmt an, daß im Verlauf der Enzymsekretion ein Teil des Proenzym in das Plasma übertritt und anschließend durch die Niere ausgeschieden wird. Der größte Teil der Enzymproduktion soll von den Drüsenzellen in das Magen-Darm-Lumen abgegeben werden, während nur ein geringer Teil in das Blut diffundieren soll. Nach JANOWITZ und HOLLANDER (17) sollen bei Nahrungsaufnahme ungefähr 99 % des von der Magenschleimhaut gebildeten - von den Autoren als einheitlich angesehenen - Pepsinogen in das Magenlumen und nur 1 % in das Blut gelangen. HIRSCHOWITZ vertritt die Ansicht, daß die proteolytischen Plasma- und Harnenzyme aus einem immer etwa gleichbleibenden Anteil von zugrundegehenden Hauptzellen stammen und über die Interzellularflüssigkeit ins Blut gelangen (16). In Übereinstimmung mit dieser Annahme wird die Plasmapepsinogen-Konzentration erhöht durch Agentien, welche die Magenschleimhaut schädigen. (HIRSCHOWITZ (16)). Die Plasmapepsinogen-Konzentration weist hingegen nur eine geringe Parallelität zur Magensaftsekretion auf.

Diese oben angeführten Theorien schließen einander nicht aus. Dementsprechend vermutet MULLER (21), daß der Übertritt des Pepsinogens aus der Magenschleimhaut ins Blut durch die Sekretionsleistung u n d a u c h durch die Anzahl der untergegangenen Hauptzellen bestimmt wird.

Gegen die Annahme einer renalen Ausscheidung des in das Plasma übergetretenen Proenzyms bestehen keine Bedenken, da die renale Passage für andere Proteine von gleicher Molekülgrösse bewiesen ist (PAPPENHEIMER (23)).

In der Bezeichnung als "Uropepsinogen" wird die Identifizierung eines im Harn ausgeschiedenen sauren proteolytischen Proenzyms mit Pepsinogen der Magenschleimhaut vorweggenommen. Sie bleibt hypothetisch, solange sie sich nicht auf exakte biochemische Kriterien stützen kann. Menschliche Pepsinogene oder Pepsine können erst dann mit dem im Harn ausgegeschiedenen proteolytischen Proenzym oder mit dem aktivierten Enzym verglichen werden, wenn sie ausreichend charakterisiert oder rein dargestellt sind.

B Die Heterogenität von Pepsin und Pepsinogen

Eine nähere Charakterisierung des Magenpepsins- und Pepsinogens wurde in den letzten Jahren durch Anwendung der Ionenaustausch - Chromatographie möglich. Mit Hilfe dieses Trennverfahrens konnte der Nachweis erbracht werden, daß das Pepsin und das Pepsinogen der Magenschleimhaut, die bis dahin als einheitlich angesehen wurden, von heterogener Beschaffenheit sind. Hierfür sprachen auch die Feststellung verschiedener pH-Optima, der Nachweis mehrerer Enzymkomponenten durch Aussalzfraktionierung und die Ergebnisse elektrophoretischer Trennverfahren. Um einen Vergleich mit dem Pepsinogen der Magenschleimhaut zu ermöglichen, ist es erforderlich, die saure proteolytische Enzymaktivität im Plasma und Harn ebenfalls auf Uneinheitlichkeit zu untersuchen. Die Identität der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Magens, des Plasmas und des Harnes wäre wahrscheinlich, wenn sich Parallelen bezüglich ihrer Heterogenität finden ließen. (z.B. gleiche Zahl proteolytisch aktiver Komponenten mit gleichen Eigenschaften bzgl. ihrer Substratspezifität, ihres chromatographischen Verhaltens usw.) Bewiesen wäre die Identität aber erst

durch den Nachweis gleicher Aminosäuresequenz der verschiedenen Magen-, Harn- und Plasmapepsinogene. Dann wäre auch die Voraussetzung zur Bestimmung der renalen Clearance der Plasmapepsinogene gegeben.

In den letzten Jahren wurde zum Nachweis der für die proteolytische Enzymaktivität verantwortlichen Proteine die Ionenaustausch - Chromatographie in Form der säulenchromatographischen Analyse in zunehmendem Maße verwendet.
Der gegenwärtige Stand der Ionenaustausch - Chromatographie des Pepsins und Pepsinogens soll im Folgenden näher dargestellt werden. Hierbei erscheint eine detaillierte Betrachtung methodischer Einzelheiten notwendig, um einen Vergleich der vorliegenden Arbeit, die sich mit der säulenchromatographischen Fraktionierung von "Uropepsinogen" befasst, mit den aus dem Schrifttum ersichtlichen Untersuchungen ähnlicher Art zu ermöglichen. Ein eingehendes Studium der bisherigen Pepsin- und Pepsinogen-Fraktionierungen ist erforderlich, da für jedes Proteinindividuum und damit auch für das "Uropepsinogen" aus der Vielfalt möglicher exterimenteller Bedingungen die für das einzelne Protein möglichst optimalen ausgewählt werden müssen.

Es erscheint zweckmäßig, zunächst eine kurze Erläuterung der Ionenaustausch-Chromatographie von Proteinen zu geben, um die bei den säulenchromatographischen Analysen des Pepsins und Pepsinogens geltenden Gesetzmäßigkeiten hervorheben zu können.

C Die Ionenaustausch-Chromatographie von Proteinen

Die Ionenaustausch-Chromatographie erlaubt die weitgehende Trennung einzelner Proteinkomponenten aus einem vorgereinigten Proteingemisch.
Die funktionellen Gruppen des Ionenaustauschers bilden mit den ionisierten Gruppen der Aminosäuren der Proteine ein System multipler elektrostatischer Bindungen aus. Die Zahl derartiger Bindungen zwischen Ionenaustauscher und Protein ist unter anderem von der Ladungsdichte und -verteilung auf der Oberfläche des Proteins abhängig (41, 26). Sie wird von Protein zu Protein verschieden sein. Auf diese Weise werden eine oder mehr Proteinkomponenten aus dem Proteingemisch an dem Ionenaustauscher fixiert. Es wird deshalb verständlich, daß z.B. Enzyme gleicher Substratspezifität aber verschiedener Ladungsdichte und -verteilung unterschiedlich feste Bindungen am Ionenaustauscher aufweisen. Sie werden demnach bei der Elution als unterscheidbare Proteinindividuen auftreten. Dieser eben geschilderte Bindungsmechanismus wird mehr oder weniger

stark durch adsorptive Bindung des Proteins am Ionenaustauscher überlagert. Im Grenzfalle kommt es zu einer irreversiblen adsorptiven Bindung (Adsorption von Proteinen an schwach sauren Kationenaustauschern auf Harzbasis bei pH 5,0 (TURBA (41)).

Der Elutionsmechanismus läßt sich vereinfacht an den beiden idealisierten Grenzfällen reiner elektrostatischer bzw. reiner adsorptiver Bindung erläutern:

Im Falle einer multiplen elektrostatischen Bindung wird oberhalb oder unterhalb einer bestimmten Wasserstoffionen-Konzentration oder oberhalb einer gewissen Ionenstärke des Elutionsmittels auch noch die letzte Bindung des Proteins an den Ionenaustauscher gelöst werden. Die Proteinkomponenten wandern dann mit derselben Geschwindigkeit wie das Elutionsmittel durch das Ionenaustauscherbett. Im Sinne der klassischen Chromatographie ist dann das Verhalten des Proteins am Ionenaustauscher durch den R_f-Wert 1 beschrieben (bzw. durch den R_f-Wert 0 für den Fall der Fixierung des Proteins am Ionenaustauscher). Andere R_f-Werte sind nicht möglich (TURBA (41)).

Bei reiner adsorptiver Bindung erfolgt die Trennung der Proteine über einen vielstufigen Adsorptions-Desorptionszyclus. Sie treten damit in mehr oder weniger breiten Banden im Eluat auf. Die R_f-Werte müßten jeden Betrag zwischen 0 und 1 annehmen können.

Das chromatographische Verhalten der meisten Proteine wird mehr oder weniger stark durch beide Mechanismen beeinflußt.

Die experimentellen Bedingungen zur chromatographischen Trennung von Proteinen sind durch deren Eigenschaften als polyvalente kompakte Makroionen gegeben. Mithin werden sie unter anderem durch die molekulare Grösse, den Ladungszustand und die Stabilität der sekundären und tertiären Strukturen bestimmt. Diese physikalisch-chemischen Parameter hängen im Lösungszustand von der ionalen Zusammensetzung, der Ionenstärke und dem pH des Äquilibrierungs- und Elutionsmittels ab. Letztere sind so zu wählen, daß die strukturelle Stabilität der zu trennenden Proteine in Lösung und am Ionenaustauscher gewahrt bleibt.

Anmerkung: Eine reversible Strukturänderung, die bei der Sorption des Proteins am Ionenaustauscher auftritt, kann durch entsprechend langsame Elution wieder rückgängig gemacht werden.

Wird die Wahl des Ionenaustauschers, des Äquilibrierungsmittels und die des Elutionsgradienten nicht richtig getroffen, so kommt es zu einer irreversiblen Strukturänderung des Proteins, d.h. der Prozeß der Denaturierung kommt in Gang.

Im Folgenden seien die zu wählenden Untersuchungsbedingungen entsprechend dem Ablauf der chromatographischen Analyse diskutiert:

1.) Das Lösungsmittel des Proteingemisches:

Der pH-Wert und die Ionenstärke des als Lösungsmittel

benutzten Puffersystems müssen so gewählt werden, daß das zu untersuchende Protein aus dem Proteingemisch an den Ionenaustauscher vollständig fixiert wird. Dieser Vorgang sollte nach Möglichkeit auf Ionenaustausch beruhen.

2.) Der Ionenaustauscher:

Die Matrix des Ionenaustauschers soll bei vorgegebenen Adsorptions- und Elutionsbedingungen keine irreversiblen Konfigurationsänderungen des zu untersuchenden Proteins bewirken. Ionenaustauscher mit hydrophiler Matrix - z.B. solche auf Zellulose- und Dextranbasis - erfüllen diese Forderungen. Infolge ihres hohen Wasserbindungsvermögens und ihrer Quellfähigkeit bieten sie zusätzlich den Vorteil einer großen Kapazität.

Die Ionenaustauscher auf Dextranbasis bilden ein dreidimensionales Netzwerk, dessen Porengröße durch verschiedene Grade der Vernetzung variiert werden kann (z.B. DEAE- Sephadex A50 bzw. DEAE- Sephadex A25). In weitmaschige Netzwerke können Proteine durch Diffusion eindringen. Somit werden dann auch die durch Diffusion erreichbaren funktionellen Gruppen des Ionenaustauschers noch besetzt. Seine funktionellen Gruppen sollen bei vorgegebenen pH-Wert dissoziiert sein und sich entsprechend dem Massenwirkungsgesetz im Gleichgewicht befinden mit den Ionen des Puffers, der zur Äquilibrierung verwendet

wurde. Es ist bekannt, daß die Porengröße von der Ionenstärke des Elutionsmittels abhängt. Mit steigender Ionenstärke wird eine "Verkleinerung" der Porendurchmesser beobachtet. Daraus ergibt sich eine Volumenverminderung der einzelnen Partikel und das gesamte Ionenaustauscher-Material in der Säule schrumpft. Dieser Effekt ist bestimmend für den hydrodynamischen Widerstand des Ionenaustauscher-Materials bei der Elution.

3.) Die Form der zu verwendenden Säule:

Die Erfahrung zeigt, daß sich Säulen mit einem Durchmesser-Höhenverhältnis von 1:10 bis 1:20 am besten zur Trennung von Proteingemischen eignen.

4.) Die Säulentemperatur:

Bei der Wahl der Temperatur ist zu berücksichtigen, daß Proteine denaturierbar sind und während des Ionenaustausches an der Säule Konfigurationsänderungen erfahren können. Bei tieferen Temperaturen laufen diese Prozesse erfahrungsgemäß nur langsam ab. Zu tiefe Temperaturen begünstigen in der Regel eine verstärkte Adsorption am Ionenaustauscher und können sich somit nachteilig auswirken (41).

5.) Das Elutionsverfahren:

Unter den verschiedenen möglichen Elutionsverfahren soll hier nur das der kontinuierlichen Gradientenelution diskutiert werden. Der Gradient wird entweder durch die

stetig sich ändernde Ionenstärke oder durch den kontinuierlich sich ändernden pH-Wert des Elutionsmittels gebildet. Durch dieses Vorgehen wird automatisch die Ionenstärke bzw. der pH-Wert erreicht, der für die Ablösung des zu trennenden Proteins vom Ionenaustauscher erforderlich ist. Durch Anwendung der kontinuierlichen Methode vermeidet man das Verbreitern der Banden und die Entstehung von Artefakten, wie sie öfters bei der stufenweisen Änderung der Ionenstärke oder des pH-Wertes auftreten (41). Zu Beginn der säulenchromatographischen Trennung eines Proteingemisches wird zweckmäßig der lineare Gradient des pH-Wertes bzw. der Ionenstärke verwendet.

Im Folgenden wird die Erzeugung eines solchen linearen Gradienten beschrieben:

Eine Mischkammer und ein Reservoir von gleichem Querschnitt werden miteinander verbunden. Nach dem Heberprinzip müssen die Flüssigkeitsspiegel beider Gefäße gleichmäßig absinken. Eine solche Anordnung ist in der folgenden schematischen Zeichnung wiedergegeben:

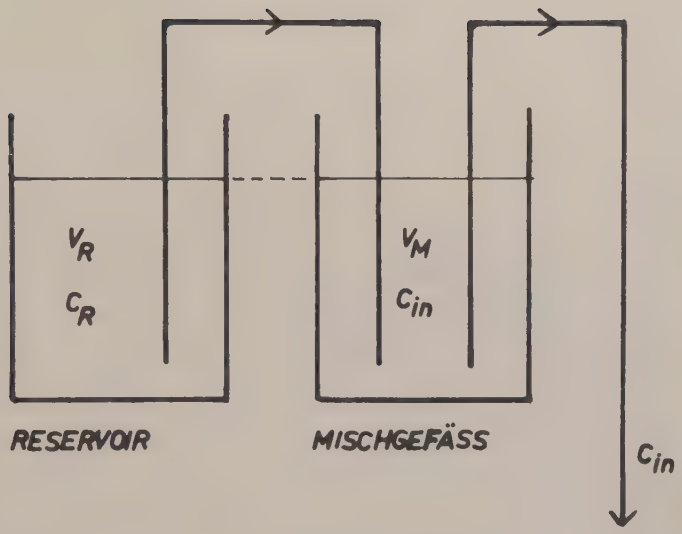


Abbildung 1: Mischbatterie zur Erzeugung eines linearen Gradienten.

Während der Elution nehmen sowohl in der Mischkammer als auch im Reservoir die Volumina der darin befindlichen Pufferlösungen um den gleichen Betrag ab. Ist zur Zeit t = 0 die Konzentration des zur Elution benutzten Salzes (meist NaCl) ebenfalls = 0, so lässt sich der Verlauf des Gradienten in Abhängigkeit von dem die Säule passierenden Volumen durch

folgende Gleichung wiedergeben:

$$C_{in} = C_R \cdot \frac{V}{V_R + V_M}$$

V_R, V_M : Volumen des Reservoirs bzw. des Mischgefäßes zur Zeit t = 0.

V : Volumen des Gradienten, das die Säule passiert.

C_{in} : Konzentration des Gradienten beim Eintritt in die Säule.

C_R : Die Konzentration des Gradienten (z.B. NaCl) im Reservoir zur Zeit t = 0.

Da $V_R = V_M$ ist, nimmt die Gleichung folgende Form an:

$$C_{in} = \frac{C_R \cdot V}{2 \; V_R}$$

6.) Die Elutionsgeschwindigkeit.

Die Flußgeschwindigkeit wird unter anderem beeinflußt durch die Partikelgröße des verwendeten Ionenaustauschers, durch deren Veränderung in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Elutionsmittels und von der geometrischen Form der Säule. Möglicherweise kann die durch die Sorption an den Ionenaustauscher veränderte Struktur eines Proteins als zeitbestimmender Faktor in die Elution eingehen, da die Rückbildung der spezifischen Faltung in vielen Fällen eine langsame Reaktion ist.
Eine Druckerhöhung, die den steigenden hydrodynamischen Widerstand kompensiert, kann leicht dazu führen, daß

deformierbare Ionenaustauscherpartikel ihre Form verändern. Je nach dem Grade der Deformierbarkeit wird die Elutionsgeschwindigkeit sich dann mit steigendem Druck nicht mehr linear ändern. Sie kann sogar mit steigendem Druck nach Durchlaufen eines Maximums wieder abnehmen, wie dies z.B. für den Ionenaustauscher DEAE-Sephadex A 50 bekannt ist. In solchen Fällen ist bei steigendem hydrodynamischen Widerstand der angewandte Druck herabzusetzen. Wird die Säule mit konstanter Durchflußgeschwindigkeit betrieben, (z.B. Autoanalyzerpumpe) so ist zu erwarten, daß mit steigendem hydrodynamischen Widerstand (steigende Ionenstärke) der Druck in der Säule zunimmt. Die Durchflußgeschwindigkeit ist so niedrig zu wählen, daß der erreichte Höchstdruck nicht kritisch wird für die Säulenanordnung.

D Die Ionenaustausch-Chromatographie von Pepsin und Pepsinogen

Der Isoelektrische Punkt des Schweinepepsins ist kleiner als 1 (25), der des zugehörigen Pepsinogens beträgt 3,7 (15). Werden demnach Schweinepepsin bzw. -pepsinogen in Puffern gelöst, deren pH größer als 1 bzw. 3,7 ist, so liegen das Pepsin und sein Zymogen als Polyanionen vor. Es wird deshalb verständlich, daß in diesem Falle zur Untersuchung von Pepsin und Pepsinogen Anionenaustauscher verwendet werden müssen. In allen bisher vorliegenden

Untersuchungen wurden Anionenaustauscher mit hydrophiler Matrix verwendet (DEAE-Cellulose). Die einzige Ausnahme machten TANG (39, 40) und RICHMOND (27, 28), die einen Anionenaustauscher mit hydrophober Matrix benutzten (Amberlite IRC 50 XE 64). Bei allen bis jetzt bekannten säulenchromatographischen Untersuchungen wurden Pepsin und Pepsinogen durch Anlegen eines pH- oder Salzgradienten eluiert. Dies weist darauf hin, daß bei der säulenchromatographischen Fraktionierung von Pepsin und Pepsinogen Ionenaustausch- und Adsorptionsvorgänge in komplizierter Weise ineinandergreifen.

Im Folgenden wird auf die Ergebnisse und die Methodik der säulenchromatographischen Analysen der einzelnen Autoren eingegangen.

II. DARSTELLUNG UND ANALYSE DER BISHER PUBLIZIERTEN SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN UNTERSUCHUNGEN DES PEPSINS UND PEPSINOGENS

A Die säulenchromatographische Analyse von Schweinepepsinogen und -pepsin an DEAE-Cellulose durch RYLE und PORTER:

RYLE und PORTER (29, 30, 31, 32, 33) untersuchten mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie vorgereinigtes Schweinepepsinogen und -pepsin. Zur säulenchromatographischen Analyse des Pepsins diente rohes, im Handel erhältliches Schweinepepsin als Ausgangsmaterial. ("Pepsin B.P. sold by HOPKIN and WILLIAMS Ltd., Chadwell Heath Essex, and manufactured solely from pig gastric mucosae"). Zur Untersuchung des Pepsinogens dienten Extrakte, die man nach einer Modifikation der Methode HERRIOTTS (HERRIOTT R.M.: In Crystalline Enzymes, 2nd ed., p.259. Ed. by NORTHROP, J.H. KUNITZ, M. & HERRIOTT, R.M., New York: Columbia University Press.) aus der Mucosa von Schweinemägen gewann.

Die Elution der durch die Ionenaustauschersäulen getrennten Enzyme, bzw. Zymogene wurde mit Hilfe eines kontinuierlich ansteigenden NaCl-Gradienten in Acetat-Puffer erreicht. Die proteolytische Aktivität des Pepsins und die potentielle des Pepsinogens wurde in beiden Fällen an den Substraten Hämoglobin und Acetyl-DL-phenylalanyl-L-diiodotyrosin gemessen.

Die Autoren definierten die proteolytischen Aktivitäten des kristallisierten Pepsins gegenüber Acetyl-DL-phenylalanyl-L-diiodotyrosin (=APD) $(P.U.)^{APD}$ und Hämoglobin

(=Hb) $(P.U.)^{Hb}$ so, daß für eine vorgegebene Pepsinkonzentration den Einheiten der Aktivität gegenüber beiden Substraten der gleiche Betrag zukam. Der Quotient $\frac{(P.U.)^{APD}}{(P.U.)^{Hb}}$ für eine vorgegebene Konzentration kristallisierten Pepsins ist damit = 1. Das gleiche muß auch für chromatographisch gereinigtes Pepsinogen gelten. Eine Pepsin- oder Pepsinogenkomponente, die das Substrat APD nicht spaltet, wird dann definitionsgemäß den Aktivitätsquotienten 0 aufweisen. Z.B. zeigen Pepsin C und sein Zymogen keine enzymatische Wirksamkeit gegenüber dem Substrat Acetyl-DL-phenylalanyl-L-diiodotyrosin.

Hat in einer Fraktionierung eine chromatographisch gereinigte Enzym- bzw. Zymogenfraktion ein weitgehend konstantes Verhältnis der enzymatischen Aktivitäten gegenüber beiden Substraten, so kann angenommen werden, daß diese Fraktion einheitlich ist. Abweichungen von dieser Konstanz führten die Autoren zur Auffindung der Zymogene B und D.

Von einer einheitlichen Fraktion, die sowohl gegenüber Hb als auch APD aktiv ist, kann man erwarten, daß das Maximum der Hb-spaltenden Aktivität bei dem gleichen Eluatvolumen auftritt bzw. bei der gleichen NaCl-Konzentration des Elutionspuffers von der Säule abgelöst wird wie das Maximum der APD-spaltenden Aktivität. Mit Hilfe dieses Kriteriums konnten die Autoren eine das Pepsinogen B begleitende geringe proteolytische Aktivität als Verunreinigung charakterisieren.

Zur zahlenmäßigen Erfassung der proteolytischen Aktivität $(P.U.)^{Hb}$ gegenüber Hämoglobin wurde die von ANSON (2, 3) gegebene Definition der Einheit der proteolytischen Aktivität gebraucht. Das Analysenverfahren zur Ermittlung der enzymatischen Wirksamkeit an dem Substrat Hämoglobin wurde in Anlehnung an die von KUNITZ, HERRIOTT u.a. angegebene Methode durchgeführt (22). Die Bestimmungsmethode der enzymatischen Wirksamkeit an dem synthetischen Substrat wurde von RYLE und PORTER entwickelt. Sie erfaßten die durch die Spaltung der Peptidbindung freiwerdende DL-Diiodotyrosinmenge mit Hilfe der Ninhydrinreaktion.

Die von RYLE und PORTER elutionschromatographisch gereinigten Pepsinogene und Pepsine werden in Tabelle 1 aufgeführt und durch die dort genannten Kriterien charakterisiert:

Die elutionschromatographisch voneinander getrennten Zymogene	NaCl-Konz., welche die Ablösung der Zymogene vom Ionenaustauscher bewirkte und das zugehörige Eluatvolumen	Aktivität gegenüber Hb in m (P.U.)Hb/mg Protein	Aktivität gegenüber APD in m (P.U.)APD/mg Protein	M_{SD}
Pepsinogen	0,29M NaCl ± 0,02M 4,36L			
Pepsinogen B				
Pepsinogen C	0,37M NaCl ± 0,02M 4,36L			40500
Pepsinogen D				

Tabelle 1: Fortsetzung Seite 25

Die elutionschromatographisch voneinander getrennten Zymogene	NaCl-Konz., welche die Ablösung der Zymogene vom Ionenaustauscher bewirkte und das zugehörige Eluatvolumen	Aktivität gegenüber Hb in m (P.U.)Hb/mg Protein	Aktivität gegenüber APD in m (P.U.)APD/mg Protein	M_{SD}
	Rechromatographie			
Pepsinogen	0,29M NaCl ± 0,02M 2,17L			
Pepsinogen B	0,224M NaCl ± 0,02 M 1,64 L		43	39000
Pepsinogen C		54,5		
Pepsinogen D	0,26M NaCl ± 0,02M 1,91L			

Tabelle 1: Fortsetzung Seite 26

Die elutionschromatographisch voneinander getrennten Enzyme	NaCl-Konz., welche die Ablösung der Enzyme vom Ionenaustauscher bewirkte und das zugehörige Eluatvolumen	Aktivität gegenüber Hb in m (P.U.)Hb/mg Protein	Aktivität gegenüber APD in m (P.U.)APD/mg Protein	M_{SD}
Pepsin	0,19M NaCl ± 0,02M 7,42L	23	23	34500
Pepsin B	0,11M NaCl ± 0,02M 2,86L			
Pepsin C	0,14M NaCl ± 0,02M 3,96L			

Tabelle 1: Fortsetzung Seite 27

Die elutionschromatographisch voneinander getrennten Enzyme	NaCl-Konz., welche die Ablösung der Enzyme vom Ionenaustauscher bewirkte und das zugehörige Eluatvolumen	Aktivität gegenüber Hb in m (P.U.)/mg Protein	Aktivität gegenüber APD in m (P.U.)/mg Protein	M_{SD}
	Rechromatographie			
Pepsin B	0,11M NaCl ± 0,02M 0,75L		40	38600
Pepsin C	0,16M NaCl ± 0,02M 1,04L	35		40700

Tabelle 1: Die enzymatisch aktiven Komponenten, die mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie aus Präparationen von Schweinepepsinogen und pepsin isoliert werden konnten.

Aus den Angaben von RYLE und PORTER konnte geschlossen werden, daß das Elutionssystem aus einem in Serie geschalteten Reservoir beliebiger Größe und einem Mischgefäß bekannten Volumens (V_M) bestand. Dieses war zu Beginn der Fraktionierung des Pepsins mit 0,1M Acetat-Puffer von pH 4,0 gefüllt, in den aus dem Reservoir 0,1M Acetat-Puffer von pH 4,0 mit 0,2M NaCl hineinlief (C_R).
Ein solches System erzeugt einen kontinuierlichen Gradienten der NaCl-Konzentration (C_{in}), dessen Verlauf vom Volumen des Mischgefässes (V_M) und dem in die Säule ausfließenden Volumen (V) abhängig ist. Er kann durch folgende Gleichung charakterisiert werden:

$$C_{in} = C_R \left(1 - e^{-\frac{V}{V_M}}\right)$$

Auf Grund dieser Gleichung kann die Konzentration an NaCl im Eluat und auch die den einzelnen Aktivitätsmaxima zugehörenden NaCl-Konzentrationen des Elutions-Puffers berechnet werden, wenn das Eluatvolumen bekannt ist, von welchem ab der Gradient angelegt wurde.

Tabelle 1 zeigt, daß die einzelnen Pepsinfraktionen und die entsprechenden Zymogene sich in eindeutiger Weise durch die NaCl-Konzentration unterscheiden, bei der sie eluiert wurden. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, daß die DEAE-Cellulose von Charge zu Charge variable Eigenschaften aufweisen kann (26) und daß das chromatographische Verhalten der Proenzyme und Enzyme durch eventuell vorhandene

Fremdproteine beeinflußt werden kann. Diese beiden Argumente schränken den Wert der Angabe der eluierenden NaCl-Konzentration als analytisches Kriterium ein.

Die Versuchsbedingungen der von RYLE und PORTER vorgenommenen säulenchromatographischen Untersuchungen sind der Tabelle 2 zu entnehmen:

Das Lösungsmittel der untersuchten Enzyme	0,1M Acetatpuffer pH 5,6
Der Ionenaustauscher	DEAE-Cellulose Äquilibriert in 0,1M Acetatpuffer pH 4
Säulendimensionen	Durchmesser: 5 cm Höhe : 35 cm
Säulentemperatur	Keine exakte Temperaturangabe. Die Versuche wurden "in der Kälte" durchgeführt
Das Volumen der Einzelfraktionen	45 ml
Das Elutionssystem	Es wurde zur Elution ein Gradient kontinuierlich ansteigender NaCl-Konzentration verwendet. Dies wurde dadurch erreicht, daß ein 0,1 Acetatpuffer von pH 4,0 der 0,2M an NaCl war, in ein Mischgefäß einlief, das ein Volumen von 2600 ml hatte
Das Lösungsmittel der untersuchten Proenzyme	0,02M Phosphatpuffer pH 6,9
Der Ionenaustauscher	DEAE-Cellulose Äquilibriert in 0,02M Phosphatpuffer pH 6,9
Säulendimension	Durchmesser: 5 cm Höhe : 10 cm
Das Volumen der Einzelfraktionen	50 ml
Die Elutionsgeschwindigkeit	50 ml/Std. = 1 Einzelfraktion

Tabelle 2

Für die Rechromatographie der von den Zymogenen hervorgerufenen Maxima potentieller proteolytischer Aktivität galten die gleichen Versuchsbedingungen mit Ausnahme der Säulendimensionen; hierdurch waren ein weniger steiler Gradientenverlauf und eine geringere Flußrate bedingt.

Die Säulendimensionen bei Rechromatographie der obengenannten Aktivitätsmaxima:

Durchmesser: 2,4 cm
Höhe : 20,0 cm

Elutionsgeschwindigkeit: ca. 22 ml/Std.

B Säulenchromatographische Untersuchungen zum Nachweis der Heterogenität des menschlichen Pepsins und Pepsinogens

Die Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des menschlichen Magensaftes mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie durch RICHMOND et al. und TANG et al.:

RICHMOND et al. (27) sowie TANG u.Mitarb. (28) unterzogen lyophilisierten menschlichen Magensaft der säulenchromatographischen Analyse. Als Säulenmaterial verwendeten sie den schwach sauren Amberlit-Ionenaustauscher IRC-50 XE 64. Es ist ein Kationenaustauscher mit hydrophober

Matrix (TURBA (41)).

Die Untersucher benutzten zur Trennung der Komponenten des menschlichen Magensaftes ein diskontinuierliches Gradientensystem von Puffern mit stufenweise ansteigenden pH-Werten. Das von RICHMOND u.Mitarb. verwendete Gradientensystem bestand aus Puffern, die in Tabelle 3 aufgeführt sind:

1. 0,2M Citratpuffer von verschiedenen pH-Werten

   pH 3,02 3,50 4,42 5,33

2. 0,2M Phosphatpuffer von verschiedenen pH-Werten

   pH 6,5 7,2

Tabelle 3: Die von RICHMOND verwendeten Elutionspuffer.

In Vorversuchen verwendeten die Autoren zur Elution Pufferlösungen, deren pH-Werte von 2,2 bis 7,5 anstiegen. Sie fanden, daß mit steigenden pH-Werten die Aktivitätsmaxima im Chromatogramm bei geringerem Elutionsvolumen erschienen. Dieses Verhalten der Proteine des Magensaftes ist analog dem des Cytochrom C, das BOARDMAN und PARTRIDGE am gleichen Austauschermaterial untersuchten (6).

Das Ionenaustauschermaterial wurde zu Beginn der eigentlichen chromatographischen Analyse durch einen 0,2M Citratpuffer auf pH 3,02 gebracht. In diesem Bereich sind die funktionellen Gruppen des Ionenaustauschers fast nicht mehr dissoziiert. Die Fixierung der Proteine und die des

Pepsins ist damit ein Vorgang, der neben elektrostatischen überwiegend auf adsorptiven Kräften beruht. Bei Vorliegen eines Adsorptionsmechanismus können Konfigurationsänderungen der einzelnen Proteinkomponenten eintreten. (Eine systematische Untersuchung des chromatographischen Verhaltens der Pepsine und ihrer Zymogene an schwach sauren Karboxylharzen im Hinblick auf elektrostatische und adsorptive Effekte steht noch aus).

TANG u.Mitarb. verwendeten ein Elutionssystem, das eine vollständige Trennung zweier proteolytischer Aktivitäten des menschlichen Magensaftes ermöglichte. Die Autoren nannten sie Pepsin und Gastricsin. RICHMOND u.Mitarb. gelang diese Trennung nur unvollständig. Das von TANG benutzte Gradientensystem bestand ebenfalls aus einer Reihe von Na-Citratpuffern mit stufenweise ansteigenden pH-Werten, unterschied sich aber durch die Abstände der Wasserstoffionenkonzentrationen der einzelnen Elutionspuffer. Diese sind der Tabelle 4 zu entnehmen:

pH	3,0	3,8	4,2	4,6

Tabelle 4: Die von TANG verwendeten Elutionspuffer.

In Abbildung 2 wird eine säulenchromatographische Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzyme des menschlichen Magensaftes graphisch dargestellt, wie sie von TANG u.Mitarb. vorgenommen wurde.

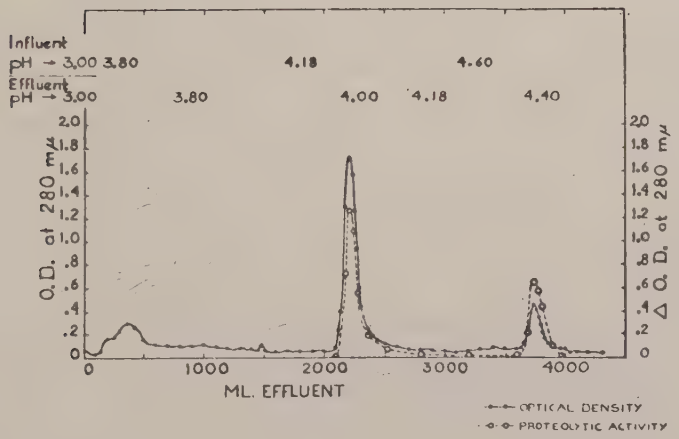


Abbildung 2: Das Chromatogramm einer Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzyme des menschlichen Magensaftes an Amberlite Ionenaustauscher IRC-50 XE 64 unter Verwendung eines diskontinuierlichen pH-Gradienten. Wie aus der graphischen Darstellung ersichtlich, treten Pepsin und Gstricsin bei den pH-Werten 4,0 bzw. 4,4 auf.

Gastricsin wurde in einem der chromatographischen Trennung folgenden Reinigungsverfahren unter Anwendung der Ammoniumsulfatfraktionierung kristallin dargestellt (4o).

Abschließend seien einige Eigenschaften des menschlichen Pepsins und Gastricsins in einer Tabelle zusammengestellt:

	Pepsin	Gastricsin
pH-Optimum	2,0	3,0
Reaktionsbedingungen zur optimalen Entfaltung der proteolytischen Aktivität	2%ige Hb-Lösung in 0,1M HCL-Citratpuffer	2%ige Hb-Lösung in 0,075M Acetat-HCL-Puffer
Relative Milkclotting Activity	44,6 %	43,3 %
Relative proteolytische Aktivität	80 %	100 %

Tabelle 5: Einige Eigenschaften des menschlichen Pepsins und Gastricsins.

Die Bestimmung der relativen Milk-clotting Activity erfolgte im Vergleich mit einer Rennin-Lösung bekannter Konzentration, deren Aktivität unter den gleichen Bedingungen gemessen wurde.
Es wurde dazu folgende Gleichung benutzt:

$$\frac{C_r \cdot T_r}{C \cdot T} \cdot 100 = \text{Aktivität in } \%$$

Erklärung der Größen in der vorher angegebenen Gleichung:

C_r = Konzentration des Rennin in µg/ml
T_r = Clotting-time des Rennin/sec.
C = Konzentration des Pepsin bzw. des Gastricsin
T = Clotting-time des Pepsin bzw. des Gastricsin

Die Versuchsbedingungen der von RICHMOND u.Mitarb. durchgeführten säulenchromatographischen Untersuchungen sind der Tabelle 6 zu entnehmen:

Lösungsmittel der untersuchten Enzyme	0,2M Citratpuffer pH 3,02
Ionenaustauscher	Amberlite IRC-50 XE 64 äquilibriert in 0,2M Citratpuffer pH 3,02
Säulendimensionen	Durchmesser: 4,5 cm Höhe : 20,0 cm
Säulentemperatur	17° C bis 22° C
Elutionsgeschwindigkeit	30 ml/Std.

Die Versuchsbedingungen der von TANG u.Mitarb. durchgeführten säulenchromatographischen Untersuchungen:

Lösungsmittel der untersuchten Enzyme	0,2M Citratpuffer pH 3,0
Ionenaustauscher	Amberlite IRC-50 XE 64 äquilibriert in 0,2M Citratpuffer pH 3,0
Säulendimension	Durchmesser: 4,4 cm Höhe : 15,0 cm
Säulentemperatur	Raumtemperatur
Elutionsgeschwindigkeit	10 ml/8 min.
Volumen der Einzelfraktionen	10 ml

Tabelle 6

Die säulenchromatographische Untersuchung von proteolytischen Proenzymen aus menschlichen Magenschleimhautextrakten:

TANG u.Mitarb. (39) gewannen proteolytische Proenzyme aus menschlicher Magenmucosa und unterzogen sie der säulenchromatographischen Analyse. Im Gegensatz zu ihren früheren Arbeiten verwendeten die Autoren DEAE-Cellulose, einen Ionenaustauscher von hydrophiler Matrix. Das Elutionssystem erzeugte einen linearen Gradienten wachsender Phosphatkonzentration, dessen pH-Wert konstant 7,5 blieb. Die Phosphatkonzentration stieg von $5x10^{-3}$M bis 0,15M an.

Die Untersucher fanden im Eluat zwei voneinander getrennte Zymogene, die sie mit IA und IB bezeichneten. Ihre Elutionsbedingungen sind der Tabelle 7 zu entnehmen:

	Phosphatkonzentrationen und Eluatvolumina, bei welchen die Ablösung der getrennten Zymogene erfolgte
Zymogen IA	0,68M PO_4 2,7 L
Zymogen IB	0,90M PO_4 3,6 L

Tabelle 7: Die von TANG u.Mitarb. säulenchromatographisch nachgewiesenen Zymogene und ihre Elutionsbedingungen.

Nach Aktivierung von Zymogen IA fand man zwei proteolytisch wirksame Enzyme. Die Identität dieser Proteasen mit den von den gleichen Autoren in früheren Versuchen gefundenen Humanpepsin und -gastricsin bewiesen sie unter anderem durch die säulenchromatographische Untersuchung an Amberlite IRC 50 XE 64. Die aus dem Zymogen IA entstandenen Proteasen zeigten das gleiche säulenchromatographische Verhalten wie Gastricsin und Pepsin. Die Autoren folgerten daraus, daß das Zymogen IA die Vorstufe dieser beiden Enzyme sei.
Auffälligerweise wurde eine entsprechende Untersuchung des Zymogen IB nicht durchgeführt.

Die Folgende Tabelle gestattet den Vergleich der aus dem Magensaft gewonnenen mit den aus dem Zymogen IA hervorgegangenen Enzymen.

	pH des Elutionspuffers, der die Ablösung der getrennten Enzyme von der Amberlite-Säule bewirkte	pH-Optimum	Elektrophoretische Beweglichkeit (ausgedrückt in cm)
Gastricsin	4,4	3,0	7,2
Gastricsin aus Zymogen IA	4,4	3,2	7,2
Pepsin	4,0	2,0	8,7
Pepsin aus Zymogen IA	4,0	2,0	8,6

Tabelle 8: Eigenschaften der aus dem Magensaft gewonnenen und der aus Zymogen IA in vitro hervorgegengenen Enzyme.

Den von TANG u.Mitarb. durchgeführten elutionschromatographischen Analysen lagen die in Tabelle 9 angegebenen Untersuchungsbedingungen zu Grunde:

Das Lösungsmittel der untersuchten Zymogene	0,05M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5
Der Ionenaustauscher	DEAE-Cellulose äquilibriert in 0,05 Kaliumphosphatpuffer von pH 7,5
Säulendimensionen	Durchmesser: 3 cm Höhe : 30 cm
Säulentemperatur	2° C bis 4° C
Die Elutionsgeschwindigkeit	0,1 ml/min.
Das Volumen der Einzelfraktionen	10 ml

Tabelle 9

Untersuchungen proteolytischer Proenzyme des menschlichen Magens durch KUSHNER u.Mitarb.

KUSHNER u.Mitarb. (18) gelang es, elektrophoretisch, immunochemisch und säulenchromatographisch das Vorhandensein von vier Pepsinogenen in lyophilisierten menschlichen Magenschleimhautextrakten nachzuweisen.
Die zunächst durch Agargel-Elektrophorese von einander getrennten vier Zymogene aus Magenschleimhautextrakten (Pepsinogen I, II, III und IV) wurden nach abnehmender Wanderungsgeschwindigkeit benannt, so daß die am schnellsten wandernde Komponente die Bezeichnung Pepsinogen I erhielt.

Die gleichen vier Pepsinogene konnten auch mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose aus den untersuchten Magenschleimhautextrakten weitgehend isoliert werden. Man ermöglichte in diesem Falle die Gradientenelution durch Anwendung eines von FAHEY (10) angegebenen Systems, welches einen kontinuierlichen Anstieg der Ionenstärke und ein stetiges Absinken des pH-Wertes des als Elutionsmittel benutzten Puffers bewirkt. Die Untersucher bedienten sich somit gleichzeitig der beiden schon erwähnten Elutionsmöglichkeiten, nämlich der pH- und der Salzgradientenelution.
Vergleicht man die genannten elektrophoretischen und säulenchromatographischen Untersuchungen miteinander, so fällt auf, daß die Pepsinogene von um so höheren Phosphat-

konzentrationen bzw. bei um so niedrigeren pH-Werten von der Ionenaustauschermatrix abgelöst werden, je größer ihre elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit ist. Dieses Phänomen ließe sich durch die Annahme erklären, daß der Gehalt der elektrophoretisch schneller wandernden Pepsinogene an basischen Aminosäuren geringer ist, wodurch eine intensivere elektrostatische Bindung dieser Pepsinogene an die positiv geladenen funktionellen Gruppen des Ionenaustauschers erfolgt. (Auf die damit zusammenhängenden Probleme wird in der Diskussion näher eingegangen). Da der Gradientenverlauf von den Autoren nicht angegeben wurde, konnten die gefundenen Pepsinogene ihren jeweiligen Elutionsbedingungen nicht zugeordnet werden. Immunelektrophoretische Untersuchungen zeigten, daß das Pepsinogen II mit dem von RYLE und PORTER säulenchromatographisch isolierten Schweinepepsinogen verwandt ist. Die breite Scala von pH-Werten, bei welchen Pepsinogen II aktiviert wird, läßt vermuten, daß es dem von TANG gefundenen menschlichen Zymogen IA entspricht. Pepsinogen IV verhält sich bezüglich mancher seiner Eigenschaften analog dem Schweinepepsinogen B. Es ist stabil in alkalischen Lösungen, ist basischer als die anderen Pepsinogene und besitzt nur schwache Aktivität gegenüber Proteinsubstraten.

Die Versuchsbedingungen, welche den von KUSHNER u.Mitarb. durchgeführten elutionschromatographischen Analysen zu Grunde lagen, sind in Tabelle 10 angegeben:

Lösungsmittel der untersuchten Zymogene	0,01M KH_2-K_2H PO_4 - Puffer pH 7
Ionenaustauscher	DEAE-Cellulose äquilibriert in 0,01M KH_2-K_2H PO_4 Puffer
Säulendimensionen	Durchmesser: 2 cm Höhe : 20 cm
Säulentemperatur	Es wurden keine Temperaturen angegeben
Volumen der einzelnen Fraktionen	10 ml
Elutionsgeschwindigkeit	20 ml/Std.
Das Elutionssystem	Die Gradientenelution wurde mit einem System erzeugt, das aus einem runden Mischgefäß und einem konischen Reservoir bestand. Das Mischgefäß enthielt zu Beginn der Fraktionierung 500 ml eines 0,01M Phosphatpuffers von pH 7,0. Das konische Reservoir enthielt 250 ml eines 0,4M Phosphatpuffers von pH 5,65. Dadurch wurde ein kontinuierlicher Anstieg der Molarität des Elutionspuffers und ein Abfall seines pH-Wertes erreicht. Nachdem beide Gefäße leer geworden waren, ließ man einen 0,4M PO_4-Puffer von pH 5,65 durch die Säule laufen, bis die Adsorption bei 280 nm zu einer stets gleich bleibenden Höhe zurückkehrte. Dann ließ man eine 0,8M NaCl in 0,4M Phosphatpuffer von pH 5,4 durch die Säule laufen.

Tabelle 10

Die säulenchromatographische Trennung menschlicher Pepsine und Pepsinogene durch SEIJFFERS, MILLER und SEGAL.

SEIJFFERS u.Mitarb. untersuchten zunächst angesäuerte Magenschleimhautextrakte mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie und fanden drei deutlich voneinander getrennte Maxima proteolytischer Aktivität, die sie auf die Existenz dreier verschiedener Pepsine zurückführten (34). Die Untersucher nannten sie entsprechend der Reihenfolge ihres Auftretens im Eluat Pepsin I, II und III. Die Entdeckung dieser Enzyme veranlaßte die Suche nach den entsprechenden Zymogenen.

Zu diesem Zwecke führten die Autoren die gleichen Untersuchungen mit nicht angesäuerten Magenschleimhautextrakten durch und fanden drei Pepsinogene, die sie wieder entspechend der Reihenfolge ihres Auftretens im Eluat mit Pepsinogen I, II und III bezeichneten. Sie erwiesen sich nach Rechromatographie als chromatographisch einheitliche Substanzen, zeigten relative Stabilität gegenüber der Einwirkung von Alkali bis zu einem pH-Wert von 9,20 und bildeten nach Aktivierung Pepsine, die im alkalischen Bereich (pH 7,20) denaturiert wurden (35, 36). Ihre proteolytische Aktivität gegenüber dem Substrat Hämoglobin erstreckte sich über einen Bereich von pH 1,5 bis pH 3,5.

In weiteren säulenchromatographischen Untersuchungen wurden verschiedene Abschnitte der Magenschleimhaut auf ihren Ge-

halt an den genannten Pepsinogenen untersucht (37). Man fand, daß im Bereich der Duodenal- und Pylorusschleimhaut nur Pepsinogen I gebildet wird. Dagegen wird von der Fundusschleimhaut neben diesem auch Pepsinogen II und III produziert. Es wurde vermutet, daß die Hauptzellen der Fundusdrüsen der Entstehungsort der zuletzt genannten Zymogene sind. Dagegen sah man keine Möglichkeit, das Pepsinogen I einem bestimmten Zelltyp zuzuordnen.

In weiteren säulenchromatographischen Untersuchungen wurden die Aktivierungsprodukte der isolierten sauren proteolytischen Proenzyme mit den aktivierten Enzymen verglichen, die aus angesäuerten Magenschleimhautextrakten gewonnen wurden. Es konnte gezeigt werden, daß das Pepsin I des sauren Magenschleimhautextraktes die gleichen chromatographischen Eigenschaften aufwies wie das aktivierte Pepsinogen I. Pepsin I scheint demnach aus einem chromatographisch einheitlichen Protein zu bestehen.

Der Vergleich von Pepsin II mit dem aktivierten Pepsinogen II zeigt, daß in diesem Falle eine einfache gegenseitige Zuordnung der beiden Enzyme wie bei Pepsin I und dem Aktivierten Pepsinogen I nicht möglich ist. Pepsinogen II ist nämlich das Zymogen zweier Pepsine, der Pepsine IIA und IIB, die sich in der säulenchromatographischen Analyse deutlich durch ihre Elutionsbedingungen unterscheiden. Pepsin IIA zeigt die gleichen chromatographischen Eigenschaften wie das Pepsin II des sauren Magenschleimhautextraktes. Pepsin IIB läßt sich chromatographisch nicht

von Pepsin III aus saurem Magenschleimhautextrakt unterscheiden, denn das von Pepsin IIB hervorgerufene Aktivitätsmaximum erscheint unter den gleichen Elutionsbedingungen wie das Pepsin III des angesäuerten Magenschleimhautextraktes. Somit stellt Pepsin III des angesäuerten Magenschleimhautextraktes ein Gemisch aus zwei chromatographisch nicht unterscheidbaren Proteinen dar.

Die den geschilderten säulenchromatographischen Analysen zu Grunde liegenden Untersuchungsbedingungen sind in Tabelle 11 wiedergegeben:

Lösungsmittel der untersuchten Enzyme und Zymogene	0,1M Acetatpuffer pH 5,3
Ionenaustauscher	DEAE-Cellulose-batch 1410 (BROWN & Co) äquilibriert in 0,1M Acetatpuffer pH 5,3
Säulendimensionen	Durchmesser: 2 cm Höhe : 20 cm
Säulentemperatur	10° C bis 15° C
Volumen der einzelnen Fraktionen	15 ml
Elutionsgeschwindigkeit	30 bis 40 ml/Std.

Das Elutionssystem zur Untersuchung der Pepsine	Durch die Säule liefen zunächst 100 ml 0,1M NaCl in 0,1M Acetatpuffer pH 5,3, dann folgten 200 ml 0,2M NaCl in 0,1M Acetatpuffer pH 5,3. Anschließend wurde die Säule mit einem Varigrad verbunden. Dieser hatte 9 Zylinder, von welchen jeder 250 ml 0,1M Acetatpuffer pH 5,3 mit darin gelöstem NaCl enthielt. Die NaCl-Konzentrationen in den einzelnen Zylindern waren 0,230M, 0,230M, 0,230M, 0,230M, 0,235M, 0,240M, 0,245M, 0,255M und 0,260M.
Das Elutionssystem zur Untersuchung der Pepsinogene	Die Elution erreichte man durch einen ansteigenden NaCl-Gradienten, den man mit Hilfe eines Varirads erzeugte. Dieser hatte 9 Zylinder, die NaCl enthielten, das in 250 ml 0,1M Acetatpuffer pH 5,3 gelöst war. Die NaCl-Konzentrationen in den einzelnen Zylindern waren 0,11M; 0,11M; 0,12M; 0,12M; 0,12M; 0,13M; 0,13M; 0,14M; und 0,16M.

Tabelle 11

Die säulenchromatographische Analyse des "Uropepsinogens".

SEIJFFERS u.Mitarb. untersuchten, filtrierten und dialysierten menschlichen Harn mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie und fanden zwei Maxima potentieller proteolytischer Aktivität (38). Im Vergleich mit dem chromatographischen Verhalten der aus der Fundusmucosa gewonnenen Pepsinogene I, II und III ergab sich, daß die beiden im Harn gefundenen Pepsinogene den Pepsinogenen II und III entsprachen.
Einer relativ großen Pepsinogen II-Aktivität folgte ein kleineres Aktivitätsmaximum an Pepsinogen III. In mehreren Chromatogrammen erwies sich das Verhältnis der Aktivitäten von Pepsinogen II zu Pepsinogen III als konstant. Die Autoren zogen daraus den Schluß, daß weitere Untersuchungen dieses Verhältnisses möglicherweise einen Anhalt über den Funktionszustand der Fundusmucosa liefern könnten. Die Konstanz dieses Verhältnisses scheint ihnen auch ein Hinweis dafür zu sein, daß Pepsinogen II und III im gleichen Zelltyp (Hauptzellen) gebildet werden.
In keinem der Chromatogramme fanden sie Pepsinogen I. Dies sei nach ihrer Meinung möglicherweise auf eine fehlende endogen-exogene Partition der Pepsinogen I-Sekretion zurückzuführen. Der Beweis für diese Annahme wäre nur durch eine elutionschromatographische Untersuchung der Serumproteine zu führen.

Der untersuchte Harn stammte von Patienten, die an einem präpylorischen oder einem Duodenalulcus litten. Bei der Untersuchung des Harnes eines gesunden Probanden fanden SEIJFFERS u.Mitarb. neben dem Pepsinogen II-Peak ein aus zwei Komponenten bestehendes Pepsinogen III-Maximum. Sie nannten diese entsprechend ihrem Auftreten im Chromatogramm Pepsinogen III "early" und Pepsinogen III "late". Aus diesem Grund halten es die Autoren für wahrscheinlich, daß im Harn mehr als zwei Pepsinogene vorhanden sind, die aber ein sehr ähnliches chromatographisches Verhalten aufweisen. Wie LEPPLA u.Mitarb. kamen auch SEIJFFERS, MILLER und SEGAL zu dem Ergebnis, daß es erst nach einer eindeutigen säulenchromatographischen Analyse der sauren proteolytischen Aktivität des Harnes möglich ist, diese zu Funktionszuständen des Magens in Beziehung zu setzen.

Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der von SEIJFFERS u.Mitarb. durchgeführten säulenchromatographischen Untersuchungen:

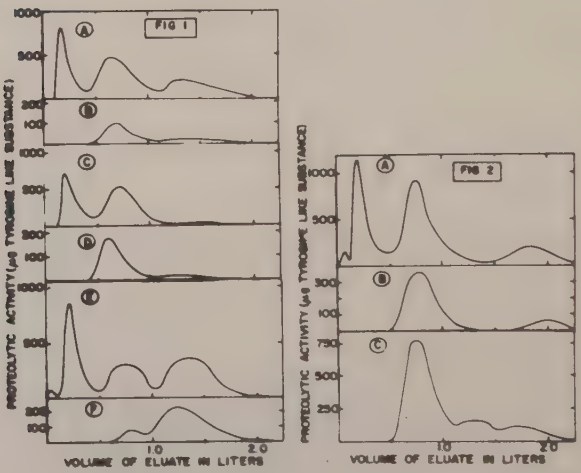


Abbildung 3:

Legende zu Fig. I: Chromatographische Fraktionierung der proteolytischen Enzyme aus Magenschleimhautextrakten und Harn von drei Patienten mit peptischen Ulcera. A: Fundusmucosaextrakt aus dem Magen des ersten Patienten. B: Urin-Probe desselben Patienten. C: Fundusmucosaextrakt aus dem Magen eines anderen Patienten. D: Urin-Probe desselben Patienten. E: Fundusmucosaextrakt aus dem Magen eines dritten Patienten. F: Urin-Probe desselben Patienten

Abbildung 3:

Legende zu Fig. II: Chromatographische Fraktionierung der proteolytischen Enzyme aus Magenschleimhautextrakt und Urin eines Patienten mit einem peptischen Ulcus und die des Harnes eines gesunden Probanden. A: Fundusmucosaextrakt aus dem Magen eines Ulcusträgers. B: Urin-Probe desselben Patienten. C: Urin eines gesunden Probanden.

Die den besprochenen säulenchromatographischen Fraktionierungen zu Grunde liegenden Versuchsbedingungen sind in Tabelle 12 angegeben:

Das Lösungsmittel der untersuchten Pepsinogene	0,1M Acetatpuffer pH 5,3
Der Ionenaustauscher	DEAE-Cellulose äquilibriert in 0,1M Acetatpuffer pH 5,3
Die Säulendimensionen	Durchmesser: 2 cm Höhe : 20 cm
Die Säulentemperatur	8° C bis 10° C
Das Volumen der einzelnen Fraktionen	15 ml
Elutionsgeschwindigkeit	2 - 3 Fraktionen/Std.
Das Elutionssystem	Die Elution wurde durch einen ansteigenden NaCl-Gradienten erreicht. Zu diesem Zwecke wurde die Säule mit einem Varigrad mit 9 Zylindern verbunden, die nacheinander folgende NaCl-Konzentrationen enthielten: 0,11M; 0,11M; 0,12M; 0,12M; 0,12M; 0,13M; 0,13M; 0,14M; 0,16M.

Tabelle 12

C Zusammenfassung der Ergebnisse der bisher publizierten elutionschromatographischen Analysen des Pepsins und Pepsinogens

Die im vorhergehenden Kapitel diskutierten elutionschromatographischen Untersuchungen der sauren proteolytischen Enzymaktivität und ihrer Vorstufe zeigen in eindeutiger Weise deren heterogene Beschaffenheit. So konnten RYLE und PORTER aus rohem Schweinepepsin neben dem eigentlichen Pepsin das Vorhandensein von zwei "Parapepsinen" nachweisen, die sie Pepsine B und C nannten. Auf der Suche nach den entsprechenden Vorstufen fanden sie vier Zymogene, die sie mit Pepsinogen, Pepsinogen B, C und D, bezeichneten. RICHMOND, TANG u.Mitarb. isolierten aus menschlichen Magenmucosaextrakten die proteolytisch aktiven Enzyme Pepsin und Gastricsin. Die Suche nach den entsprechenden Enzymvorstufen führte zum Nachweis der Zymogene I A und I B, wovon sich das erstere als Vorläufer der beiden genannten sauren proteolytischen Enzyme erwies. KUSHNER u.Mitarb. gelang die Trennung von vier Pepsinogenen, die sie auf Grund ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit Pepsinogen I, II, III und IV nannten. SEIJFFERS u.Mitarb. fanden durch elutionschromatographische Untersuchungen von menschlichen Magenschleimhautextrakten drei Zymogene,

die sie entsprechend der Reihenfolge ihres Auftretens im Chromatogramm Pepsinogen I, II und III nannten. Nach Aktivierung entstanden aus den genannten Zymogenen vier Pepsine, da das Pepsinogen II zwei aktive Enzyme lieferte, die Pepsin II A und II B genannt wurden. Elutionschromatographische Untersuchungen von Extrakten aus anatomisch unterschiedlich lokalisierten Schleimhautabschnitten des Magens erbrachten den Nachweis, daß im Bereich der Pylorus- und Duodenalschleimhaut nur Pepsinogen I, im Fundusbereich dagegen auch Pepsinogen II und III gebildet werden.
Aus menschlichem Harn konnten SEIJFFERS u.Mitarb. mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie zwei Pepsinogene getrennt darstellen. Aus ihrem chromatographischen Verhalten konnte geschlossen werden, daß es sich um die Pepsinogene II und III handelte. Da bei einer elutionschromatographischen Untersuchung das dem Pepsinogen III entsprechende Aktivitätsmaximum aus zwei Komponenten bestand, hielten die Autoren das Vorkommen von mehr als zwei Pepsinogenen im Harn für wahrscheinlich.

Die Unterscheidung der von den einzelnen Untersuchergruppen elutionschromatographisch getrennten Enzyme bzw. Zymogene war meist durch die Verschiedenheit ihrer Substratspezifität, ihrer pH-Optima, ihrer Alkalistabilität und in jedem Falle durch die unterschiedlichen Elutionsbedingungen möglich.
Ein Vergleich der von den verschiedenen Autoren gefundenen

Enzyme und Zymogene ist wegen erheblicher Unterschiede in der Methodik nur bedingt möglich.
Das zeigen die Aufstellungen der den einzelnen säulenchromatographischen Analysen zu Grunde liegenden Untersuchungsbedingungen. Wie in einem früheren Abschnitt dargelegt, bestimmt jeder dieser physikalisch-chemischen Parameter das säulenchromatographische Verhalten der zu trennenden Proteine.
Immerhin konnte auf Grund einiger gemeinsamer Eigenschaften eine Identität der unter verschiedenen Bedingungen nachgewiesenen Enzyme und Proenzyme zwar nicht bewiesen aber doch wahrscheinlich gemacht werden.
So zeigte das Gastricsin von TANG bei einer von SEIJFFERS durchgeführten Untersuchung an DEAE-Cellulose ein dem Pepsin I ähnliches chromatographisches Verhalten. Es wurde daher von SEIJFFERS angenommen, daß das Pepsin TANGs eine Mischung der von ihm gefundenen Pepsine II A, II B und III sei. Nach den Angaben von KUSHNER entsprechen die von ihm entdeckten Pepsinogene III, II und I den von SEIJFFERS gefundenen Pepsinogenen I, II und III. Das von RYLE und PORTER gefundene Schweinepepsin B gleicht in mancher seiner Eigenschaften dem Pepsin I von SEIJFFERS. Es ist relativ alkalistabil und wird vor den anderen Schweinepepsinen von der DEAE-Cellulose abgelöst.

III. PROBLEMSTELLUNG

Untersuchungen von FREIS und LEPPLA (19) gaben erste Anhaltspunkte für die Annahme, daß die bisher summarisch als "Uropepsinogen" bezeichnete saure proteolytische Enzymaktivität des menschlichen Harnes uneinheitlich ist.

Da durch die von RYLE und PORTER sowie von TANG u.Mitarb. durchgeführten chromatographischen Analysen der Nachweis der Heterogenität des Schweine- und Humanpepsinogens erbracht war, konnte man erwarten, daß die einzelnen Komponenten des Pepsinogens ebenfalls im Harn ausgeschieden werden und dort nachweisbar sein müssen. Hierbei ist vorausgesetzt, daß die von der Magenmucosa gebildeten Zymogene nach dem Prinzip der exogen-endogenen Partition der Enzymsekretion (JANOWITZ und HOLLANDER) in das Plasma übertreten und nach glomerulärer Passage in den Harn gelangen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie die saure proteolytische Enzymaktivität des Harnes auf ihre bis dahin nur vermutete heterogene Beschaffenheit zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden elutionschromatographische Untersuchungen an vorgereinigten und angereicherten Präparationen der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes zweier gesunder Probanden vorgenommen. Durch wiederholte Untersuchungen der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes eines Probanden sollte die Reproduzierbarkeit der chromatographischen Analysen geprüft und bewiesen werden.

Während dieser Untersuchungen erschienen die bereits diskutierten Mitteilungen von SEIJFFERS u.Mitarb., aus denen sich das Vorhandensein von mindestens zwei sauren proteolytischen Proenzymen ("Uropepsinogen" II und III) im menschlichen Harn ergab.

IV. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A Methodischer Teil

1.) Die Vorreinigung der zu untersuchenden sauren proteolytischen Proenzyme des Harnes.

Nach Entfernung geformter Harnbestandteile besteht die genannte Vorreinigung im wesentlichen aus der Trennung niedermolekularer Substanzen von solchen, deren Molekulargewicht über 10 000 liegt. Dies geschieht mit Hilfe der Ultrafiltration. Die dadurch entstehenden Proteinkonzentrate werden durch nachfolgende Dialyse äquilibriert und die dabei entstehenden Niederschläge abzentrifugiert.

Experimentelle Grundlagen:

Zentrifugation.
Frischer Urin eines gesunden menschlichen Probanden wurde 10 Minuten bei 1300 g zentrifugiert, um ihn von allen geformten Bestandteilen zu befreien.

Ultrafiltration.
Zur anschließenden Ultrafiltration wurden das Gerät MD 140-30 und Ultrafilter Lsg 60 Ø 140 mm verwendet (Membranfilter-Gesellschaft GmbH, Göttingen). Vor Gebrauch wurden sie für 20 - 30 Minuten in 0,9%ige NaCl-Lösung gelegt. Dadurch wurde die zur Aufbewahrung der Membranen dienende Lösung (20%iger Äthylalkohol + 2%iger Formaldehyd) entfernt. Die Filtration wurde bei +4° C durchgeführt. Stick-

stoff wurde als Druckgas verwendet. Der Filtrationsdruck betrug 30 Atm.. Die Filtration erstreckte sich über eine Zeit von 6 - 9 Stunden.
Durch dieses Vorgehen wurden die makromolekularen Substanzen des Harnes angereichert, da der mittlere Porendurchmesser der verwendeten Membranen für Substanzen mit einem Molekulargewicht über 10 000 undurchlässig ist. Darunter müssen sich auch die Proteine befinden, die für die saure proteolytische Enzymaktivität des Harnes verantwortlich sind.
Der weiße, schleimige Niederschlag, der sich auf dem Filter bildete, wurde mit einer physiologischen Kochsalzlösung abgeschwemmt. Die somit erhaltenen Konzentrate an makromolekularen Substanzen - im folgenden immer als "Harnkonzentrate" bezeichnet - wurden anschließend eingefroren.

Dialyse der Harnkonzentrate.
Die Harnkonzentrate wurden vor der chromatographischen Analyse aufgetaut und 24 Stunden in einem Visking-Schlauch gegen 0,1M Na-Acetat-Puffer von pH 5,6 bei $+4^{\circ}$ C dialysiert. Sich dabei bildender Niederschlag wurde durch Zentrifugieren entfernt.

2.) Die Wahl des Ionenaustauschers.

Bei den hier vorliegenden Untersuchungen wurde folgendes Säulenmaterial verwendet:

DEAE-Sephadex A 25 Fine Anion Exchanger

Lot. No. To 8870 F

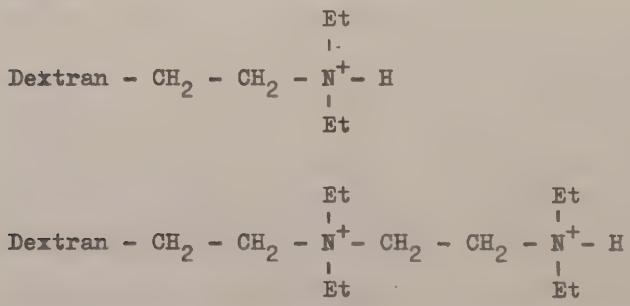
Für die Wahl dieses Ionenaustauschers waren Überlegungen ausschlaggebend, die im Folgenden ausführlich wiedergegeben werden sollen.

Wie in der Einleitung gezeigt wurde, sind Ionenaustauscher mit hydrophiler solchen mit hydrophober Matrix vorzuziehen. Es mußte ein Anionenaustauscher gewählt werden, da das zu untersuchende "Uropepsinogen" bei dem zu wählenden pH seines Lösungsmittels und des Elutionspuffers als Polyanion vorliegt. Diese Annahme ist auf Grund des Isoelektrischen Punktes des Schweinepepsinogens (3, 7) gerechtfertigt. DEAE-Cellulose und der aus vernetzten Dextranketten bestehende Ionenaustauscher DEAE-Sephadex entsprechen den geforderten Eigenschaften. Die auf Cellulosebasis hergestellten Ionenaustauscher haben aber den entscheidenden Nachteil, daß sich ihre Eigenschaften von Charge zu Charge ändern. Diese Austauscher unterscheiden sich beträchtlich in ihrem Gehalt an ionisierbaren Gruppen, in der Form ihrer Titrationskurve und in der Verteilung ihrer Partikelgröße (26). Hinzu kommt, daß die Eigenschaften der Cellulose, die zur Herstellung der Austauscher verwendet wird, erheblich schwanken können. Das hat zur Folge, daß mit wechselnder Charge Chromatogramme verschiedenen Profils und verschiedener Trennschärfe bei

gleichen Elutionsbedingungen auftreten können. DEAE-Sephadex ist ein synthetischer Austauscher. Es ist daher zu erwarten, daß er sich durch größere Konstanz seiner Eigenschaften auszeichnet.

Träger der funktionellen Gruppen des Ionenaustauschers DEAE-Sephadex ist seine dreidimensionale Dextranmatrix.

Der Ionenaustausch läuft an zwei verschiedenen funktionellen Gruppen ab - einer einfachen und einer doppelten DEAE-Gruppe:



Beide Gruppen unterscheiden sich durch ihren $P_K^{\perp}$-Wert. Die einfache Gruppe hat einen $P_K^{\perp}$-Wert von 9,5, die doppelte Gruppe einen $P_K^{\perp}$-Wert von 5,7.

Abbildung 4 zeigt die Titrationskurve des Ionenaustauschers DEAE-Sephadex:

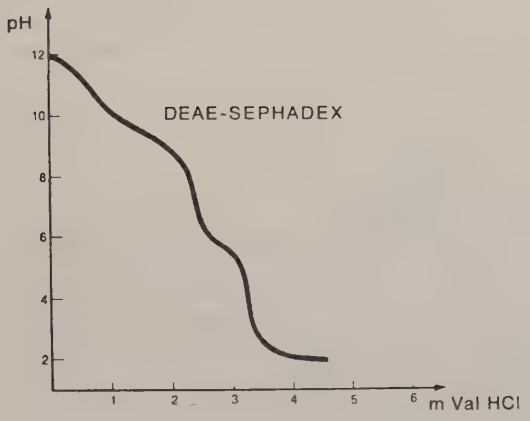


Abbildung 4: Die Titrationskurve des Ionenaustauschers DEAE-Sephadex. Der Austauscher, der als Protonenakzeptor vorliegt, wird mit HCl titriert. Entsprechend den beiden P_K-Werten müssen zwei Wendepunkte in der Titrationskurve auftreten.

Der pH des Puffers, in dem das Ionenaustauschermaterial äquilibriert wurde, betrug 5,6. Bei dieser Wasserstoffionenkonzentration sind etwa 50 % der doppelten und 100 % der einfachen DEAE-Gruppen zum Ionenaustausch befähigt. Adsorptionsbindungen sind wegen der hydrophilen Matrix hier nur in geringem Maße zu erwarten.

Da die Elution der zu trennenden Proteine mit Hilfe eines kontinuierlich ansteigenden NaCl-Gradienten erreicht wurde, war eine Schrumpfung des Ionenaustauschermaterials mit zu-

nehmenden Kochsalzkonzentrationen des Elutionspuffers zu erwarten. Diesen Effekt veranschaulicht Abbildung 5:

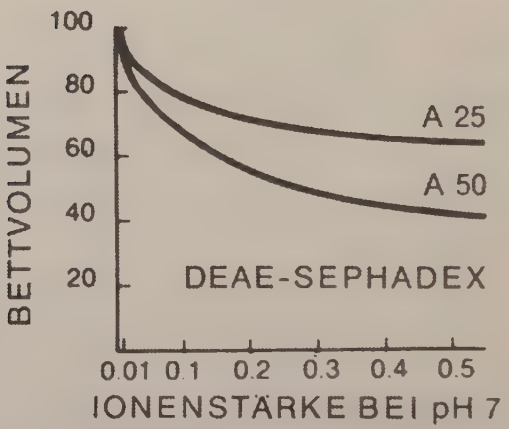


Abbildung 5: Die Volumenänderung des Ionenaustauscherbettes in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Elutionspuffers bei konstanter Wasserstoffionenkonzentration.

Das Ausmaß der Schrumpfung läßt sich auf Grund der voneinander verschiedenen Versuchsbedingungen der einzelnen Fraktionierungen und der oben gezeigten Darstellung nur angenähert abschätzen. Diese aber erklärt prinzipiell den steigenden hydrodynamischen Widerstand in den Säulen während der elutionschromatographischen Analysen.

3.) Die Aufbereitung des Säulenmaterials.

12 g DEAE-Sephadex A 25 Fine wurden eingewogen und über Nacht in einem ausreichenden Volumen bidestillierten Wassers gerührt. Nachdem sich das suspendierte Säulenmaterial abgesetzt hatte, wurde die darüber stehende Flüssigkeit dekantiert. Das Ionenaustauschermaterial wurde dann in 500 cm^3 einer 0,5M HCl gegeben und 10 Minuten kräftig gerührt. Anschließend wurde die Salzsäure mit Hilfe eines Büchner TRICHTERS am Wasserstrahlvakuum entfernt. Es wurde solange bidestilliertes Wasser nachgefüllt, bis die Spülflüssigkeit einen pH von 5 - 6 hatte.[1)] Anschließend wurde der Ionenaustauscher mit 500 cm^3 einer 0,5n Natronlauge versetzt und 20 Minuten lang gerührt. Durch Absaugen und Spülen mit bidestilliertem Wasser wurde die anhaftende Natronlauge entfernt. Der pH der Waschflüssigkeit war demnach annähernd 5 - 6.[2)] Das so vorbehandelte Säulenmaterial wurde nun in 1 Liter 1M Na-Acetat-Puffer (pH 5,6) über Nacht gerührt. Nach Absaugen wurde der Ionenaustauscher in 2 Liter 0,1M Na-Acetat-Puffer (pH 5,6) durchgespült. Die Geschwindigkeit, mit der dieser Puffer durch die Säule gepumpt wurde, betrug 0,235 ml pro Minute.

1) Dieser erste Schritt ist nicht unbedingt erforderlich; durch ihn soll nur erreicht werden, daß der Austauscher in der Cl^--Form vorliegt.

2) Durch diese Behandlung wird erreicht, daß der Austauscher erneut Anionen binden kann.

Anschließend wurden die Harnkonzentrate, deren proteolytische Gesamtaktivität vorher bestimmt worden war (siehe Seite 77), mit einer Autoanalyzerpumpe auf das obere Ende der Säule aufgepumpt.

4.) Das Anlegen des Gradienten.

Nun wurde das Elutionssystem an die Säule angeschlossen. Übereinstimmend mit den Beobachtungen von RYLE und PORTER trat nach Anlegen des Gradienten im Eluat eine pH-Verschiebung zum Alkalischen auf. Diesen Effekt veranschaulicht folgende Abbildung:

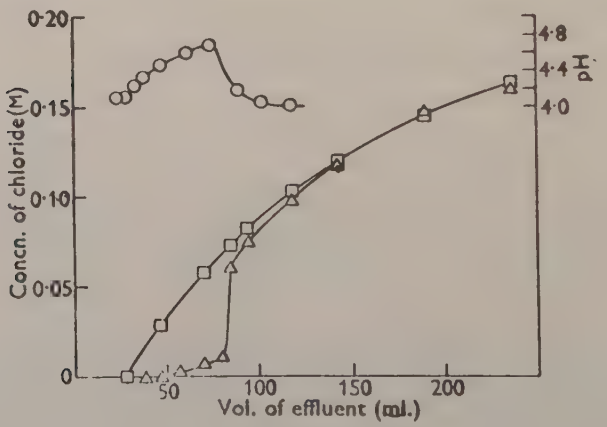


Abbildung 6: Änderung der Chlorid- und Wasserstoffionenkonzentration nach Anlegen des Gradienten (29).
Säule: Diäthylaminoäthyl-Cellulose,
1,2 cm x 27,5 cm.
Puffer: 0,1M Acetat-Puffer pH 4,0.
Gradient: 0 - 0,2M NaCl in 0,1M Acetat-Puffer pH 4,0; Mischgefäß, 125 ml;
o pH des Eluates (rechte Ordinate).
□ errechnete Chloridkonzentration.
Δ gefundene Chloridkonzentration.

Um den oben genannten Effekt auszuschalten, wurden die Säulen bei den letzten der hier vorliegenden Untersuchungen vor Anlegen des Gradienten von einem 0,1M Na-Acetat-Puffer durchströmt, der 0,025 bis 0,05 molar an NaCl war. Die Änderung des pH-Wertes durch eine solche Vorbehandlung zeigt Abbildung 7:

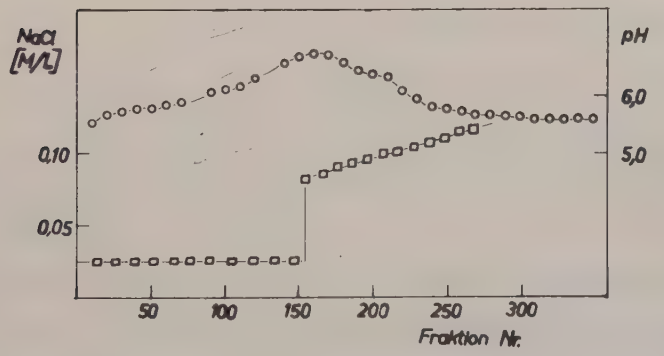


Abbildung 7: Änderung der Wasserstoffionenkonzentration im Eluat durch Vorspülen der Säule mit einem Puffer, dessen Ionenstärke so niedrig ist, daß es nicht zu einem Ablösen der zu untersuchenden Proteine vom Ionenaustauscher kommt.
o pH des Eluates (rechte Ordinate).
□ Chloridkonzentration.
Der plötzliche Anstieg der Chloridkonzentration ist durch den Beginn des Gradienten bedingt.

Da durch dieses Vorgehen die pH-Schwankungen, die stets zu Beginn der ersten Fraktionierungen auftauchten, vorweggenommen werden konnten, wurde in den späteren Untersuchungen das Gradientensystem erst dann an die Säule angeschlossen, wenn der pH des Eluates absank oder konstant war. Hierdurch wurde erreicht, daß die zu untersuchenden Proteine erst bei konstantem pH der aus der Säule ausfließenden Fraktionen eluiert wurden.

5.) Das Elutionssystem.

Das Elutionssystem bestand aus zwei zylindrischen Gefäßen, die mit Hilfe eines Hebers verbunden waren. Eines der Gefäße, das als Mischkammer diente, enthielt zu Beginn der Fraktionierung 2 Liter 0,1M Na-Acetat-Puffer, der meistens 0,08 molar an NaCl war. Der andere Behälter diente als Reservoir und enthielt 2 Liter 0,1M Na-Acetat-Puffer, der gewöhnlich 0,28 molar an NaCl war. Der pH der Puffer betrug 5,6. Der Inhalt beider Gefäße wurde während der gesamten Fraktionierdauer ständig gerührt. Da beide Behälter den gleichen Querschnitt hatten, konnte auf diese Weise ein linearer NaCl-Gradient erzeugt werden. Der Elutions-Puffer wurde mit einer Proportionierpumpe (Autoanalyzerpumpe) auf das obere Ende der Säule aufgepumpt und das Eluat einem Radi Rac-Fraktionssammler zugeführt, dessen Wechselzeit 10 Minuten betrug.

6.) Die automatische Bestimmung der sauren proteolytischen Enzymaktivität.

Die Messung der sauren proteolytischen Enzymaktivität in den einzelnen Eluatfraktionen mittels diskontinuierlicher Verfahren hätte einen unnötig großen Arbeitsaufwand erforderlich gemacht, da bis zu 1 700 Fraktionen während eines Versuches anfielen. Zudem hätten die mit solchen Verfahren verbundenen Zeitverluste zur Enzymdenaturierung führen können. Es wurde deshalb eine automatische Meßmethode verwendet, die im folgenden beschrieben werden soll. Ihre technischen Einzelheiten und die kritische Diskussion dieses Verfahrens sind der laufenden Dissertation von A. WEIDLER zu entnehmen.

Angesäuerte Proben der einzelnen Eluatfraktionen wurden nacheinander einem kontinuierlichen Substratstrom (0,5%ige Hb-Lösung) zugeführt. Nach Passage einer Inkubationsschlange wurde der Enzym-Substratstrom in ein zweites automatisches System gegeben. Dort wurde die Konzentration der Reaktionsprodukte als Folin-Lowry-positives Material bestimmt. Vor Eintritt in das zweite System wurden die Reaktionsprodukte durch kontinuierliche Dialyse vom Reaktionsgemisch getrennt. Die Bestimmung der Enzymaktivität ergab sich aus einem Vergleich der Reaktionsproduktkonzentrationen, die durch unbekannte Enzymkonzentrationen und durch bekannte Konzentration eines Bezugsenzyms hervorge-

rufen wurden. Man ermöglichte diesen Vergleich, indem man bekannte Konzentrationen des Bezugsenzyms unter den gleichen Bedingungen reagieren ließ wie die zu untersuchende Enzymaktivität.

Als Bezugsenzym wurde Schweinepepsinogen gewählt. Seine Verwendung als Eichsubstanz ist nur dann zulässig, wenn sein Reinheitsgrad bekannt ist. Dieser kann vorausgesetzt werden bei standardisierten Herstellungsverfahren. Außerdem soll das kinetische Verhalten der Eichsubstanz ähnlich dem des untersuchten Pepsinogens sein. Diese Forderungen erfüllt z.B. das bei den hier vorliegenden Untersuchungen verwendete Präparat (Dissertation BROKATE (7)):

Pepsinogen - PG (hog stomach)
Crude preparation
Aktivity: Approximately 1/3 of crystalline pepsin.
Prep.: HERRIOTH, J. Gen. Physiol., 21, 501 (1938).
Hersteller: Mann Research Laboratories, New York. Cat. No. 725.

Unter Verwendung dieses Präparates als Bezugsenzym konnte das "Uropepsinogen" in Äquivalenten Schweinepepsinogen angegeben werden.

Abbildung 8 zeigt eine Eichkurve für Pepsinogen:

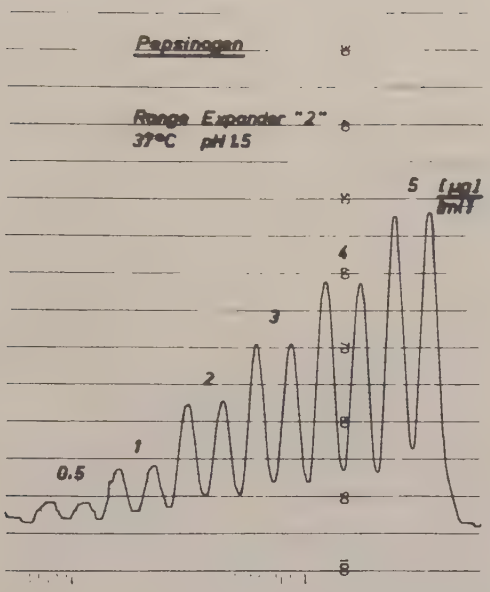


Abbildung 8: Eichkurve für Pepsinogen.

Apparatur:

Das System stellt eine Kombination von Autoanalyzer-Elementen dar.

Fließdiagramm:

Ein Fließdiagramm ist in Abbildung 9 wiedergegeben:

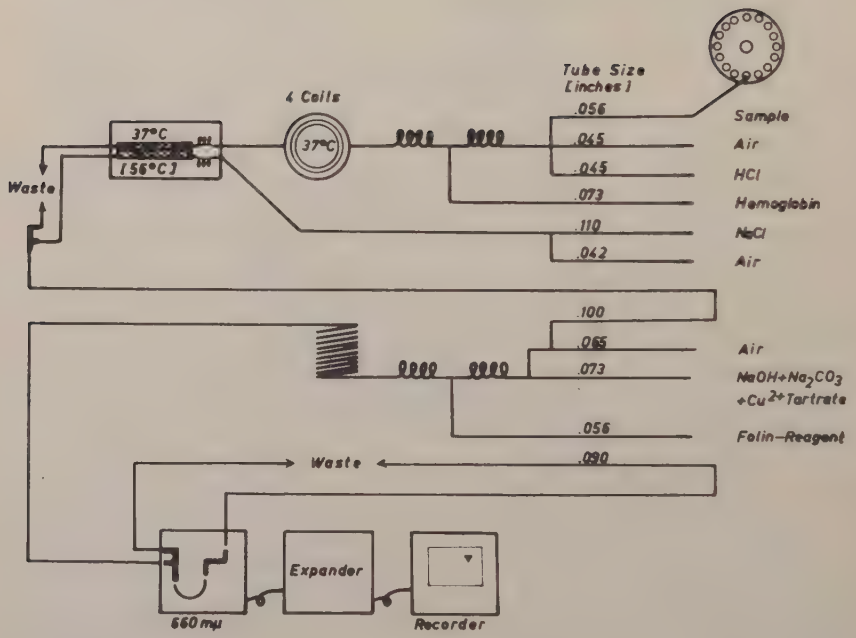


Abbildung 9: Fließdiagramm des automatisierten Bestimmungsverfahrens für saure proteolytische Enzymaktivitäten.

Reagenzien:

1. 0,217 N HCl für einen pH des Reaktionsgemisches von 2,1

   0,290 N HCl für einen pH des Reaktionsgemisches von 1,5.

2. Hämoglobin-Lösung 0,5 g/100 ml

   Herstellung: 15 g Hämoglobin (Hemoglobin Substrate, Salt free, Nr. 2382; Mann Res. Lab, New York, N.Y.)

werden mit etwa 500 ml bidestilliertem Wasser vorsichtig angerührt und auf 3,0 L mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Nach 30 Minuten wird die Lösung auf einer Nutsche abgesaugt (Filter SCHLEICHER und SCHÜLL Nr. 595). Anschließend wurde die Lösung bei 5 - 10° C für 30 Minuten bei etwa 1 300 g zentrifugiert. Nach Dekantieren wird die Lösung bei +4° C aufbewahrt und ist dort 24 Stunden haltbar.

3. Natriumchlorid-Lösung: 0,9 g/100 ml H_2O

4. Alkalische Cu-Tartrat-Lösung:
   Herstellung: Lösung I:
   0,75 g $CuSO_4.5H_2O$ p.A./300 ml H_2O
   Lösung II:
   2,25 g K-Na-Tartrat.$4H_2O$ p.A. und 60 g Na_2CO_3 wasserfrei werden mit 0,6 N NaOH auf 2 700 ml aufgefüllt. Jeweils 100 ml der Lösung I werden zu 900 ml der Lösung II zugesetzt und ergeben so die "alkalische Cu-Tartrat-Lösung".

5. Folin-Reagenz: Reagenz nach Folin-Ciocalteu (FDIN, A. and CIOCALTEN, V.: J. Biol. Chem. 73, 627 (1927)) wird 1 : 3 mit H_2O verdünnt.

Filter: 660 nm

pH-Wert:
Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wird bei vorgegebener Wasserstoffionenkonzentration und Ionenstärke der Proben-

flüssigkeit durch die Konzentration der im Testsystem hinzugefügten HCl festgelegt. Um eine konstante Wasserstoffionenkonzentration zu erreichen, muß im Intervall zwischen zwei Aspirationen von Proben durch den für die Luftzufuhr vorgesehenen Pumpschlauch ein geeigneter Na-Acetat-Essigsäure-Puffer von gleichem pH-Wert aspiriert werden. Man erreicht dies in üblicher Weise durch einen Doppelbügel am Probennehmer.

Eichlösung:
Pepsinogen (0,5 - 5 µg/ml)

Empfindlichkeit:
Es können in diesem Testsystem noch Pepsinogenkonzentrationen von 0,15 µg/ml erfaßt werden. Die Reproduzierbarkeit entspricht ± 0,1 µg/ml im Meßbereich zwischen 0,5 - 5 µg/ml Pepsinogen.

Proben:
Eine Leerwertbestimmung ist erforderlich, um in den zu analysierenden Proben und in dem Bezugsenzym eventuell vorhandenes, bei +56° C dialysables Folin-Lowry-positives Material erfassen zu können. Diese Leerwertbestimmung erfolgt im gleichen System unter Ersatz des Substrates durch 9%ige NaCl-Lösung. Gleichzeitig muß die HCl-Konzentration herabgesetzt werden, um in dem veränderten Inkubationsstrom den gleichen pH-Wert zu erhalten. Die Leerwerte werden auf Tyrosin bezogen. Diese Tyrosin-Äquivalente werden von den

ebenfalls in Tyrosin-Äquivalenten zu messenden Reaktionsproduktkonzentrationen subtrahiert.

Analysengeschwindigkeit:
Der Probennehmer wird auf 40/h eingestellt und mit einer alternierenden Reihe von Proben und 0,1M Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6 besetzt.

Eichkurven:
Eine Eichkurve für Pepsinogen ist auf Seite 72 wiedergegeben.

Die Bestimmung der Chloridkonzentration in den einzelnen Eluatfraktionen:
Die Bestimmung der Chloridkonzentration in den einzelnen Eluatfraktionen erfolgte mercurimetrisch mittels einer Modifikation der üblichen Autoanalyzer-Methode.

B Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der hier vorgenommenen säulenchromatographischen Untersuchungen wiedergegeben werden:

1. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes.

Proband: Der untersuchte Urin stammte von einem gesunden, 24 Jahre alten Kandidaten der Medizin (A.W.).

Die eingesetzte "Uropepsinogen"-Menge entsprach 1,9 mg ± 0,1 mg Schweinepepsinogen. Sie ist das Produkt aus der in ml ausgedrückten verwendeten Harnkonzentratmenge und der darin befindlichen proteolytischen Aktivität pro ml. Diese wurde durch viermalige Messung mit Hilfe des automatischen Testsystems bestimmt. Der oben angegebene Wert stellt das arithmetische Mittel dieser vier Meßergebnisse dar. Für jede dieser Messungen wurde eine Leerwertbestimmung durchgeführt. Diese zeigten, daß in den verwendeten Harnkonzentraten kein Folin-Lowry-positives Material vorhanden war. In allen folgenden Untersuchungen wurde die eingesetzte "Uropepsinogen"-Menge auf diese Weise bestimmt.

Versuchsbedingungen:

Lösungsmittel des Harnkonzentrates	0,1M Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6
Ionenaustauscher	DEAE-Sephadex A 25 Fine Anion Exchanger Lot. Nr. To 8870 F
Säulendimensionen	Durchmesser: 2 cm Höhe : 11 cm
Säulentemperatur	+5° C
Fraktionierung	Radi Rac-Fraktionssammler, Zeitschaltung
Volumen der Einzelfraktionen	6,0 ± 0,3 ml
Elutionsgeschwindigkeit	0,6 ml/Min.

Zahl der Fraktionen pro Stunde	6
Elutionssystem	Das Mischgefäß des bereits früher beschriebenen Elutionssystems enthielt 1 Liter 0,1M Na-Acetet-Essigsäure-Puffer pH 5,6 ohne NaCl-Zusatz. Das Reservoir enthielt 1 Liter des gleichen Puffers, der 0,5 molar an NaCl war. Dadurch wurde ein kontinuierlicher Anstieg der NaCl-Konzentration von 0 bis 500 mÄq. NaCl erreicht.

Die proteolytische Aktivität wurde bei pH 2,1 gemessen.

Das Diagramm der ersten Fraktionierung ist in Abbildung 10 wiedergegeben:

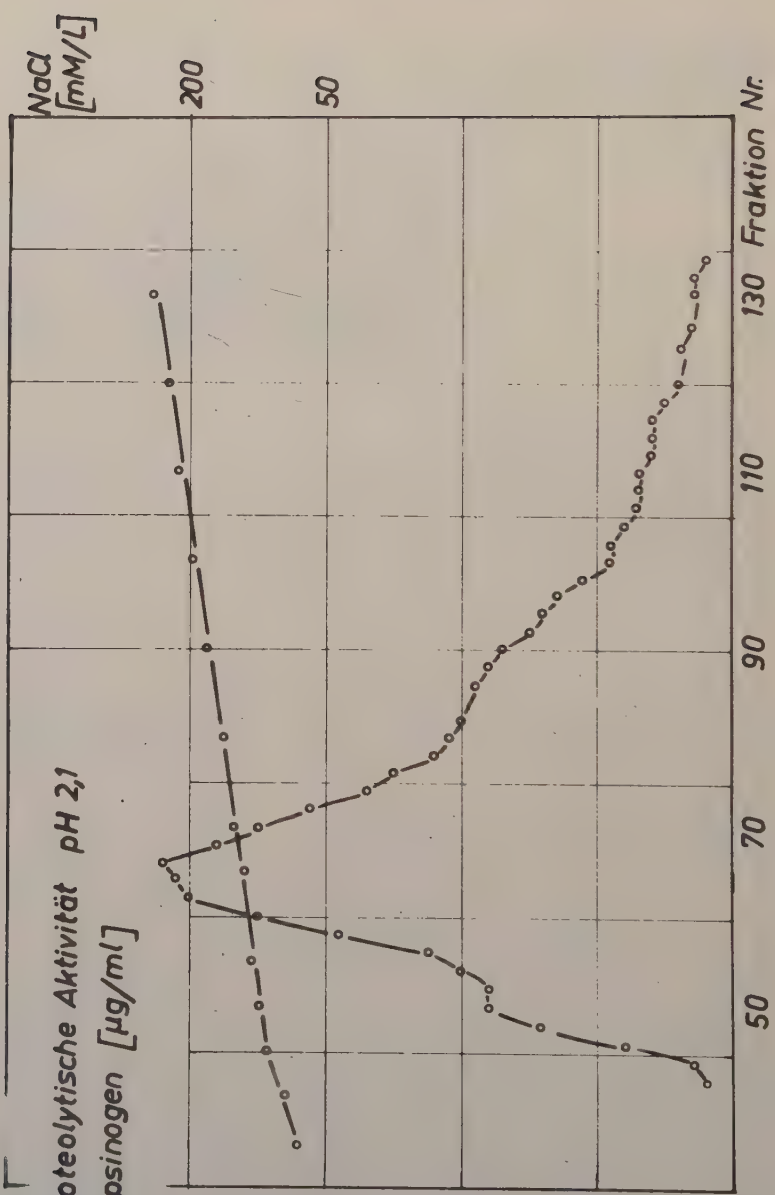


Abbildung 10: Legende siehe Seite 80.

Abbildung 10: 1. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes.
Linke Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen.
Rechte Ordinate: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/L.
Abszisse: Fraktion Nr.

Beschreibung und Diskussion des Diagrammes:
Das Diagramm der ersten hier durchgeführten "Uropepsinogen"-Fraktionierung zeigt ein Maximum proteolytischer Aktivität, das in seinem aufsteigenden und absteigenden Schenkel jeweils eine Stufenbildung erkennen läßt. Dies legt die Vermutung nahe, daß sich innerhalb dieses Aktivitätsmaximums zwei weitere befinden, die auf Grund mangelnder Trennung nur ungenügend in Erscheinung treten konnten.

Der relativ steile Anstieg des Gradienten kann als Ursache der mangelnden Auftrennung der proteolytischen Aktivität angesehen werden. Aus diesem Grunde wurde in den folgenden Fraktionierungen das Fraktionsvolumen durch eine Verminderung der Elutionsgeschwindigkeit herabgesetzt und ein weniger steiler Gradientenverlauf erzeugt. Letzteres erreichte man durch Verdoppelung der Puffervolumina im Mischgefäß und im Reservoir. Die Wiedergewinnung an proteolytischer Aktivität betrug 50 %.

2. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes.

Proband: Der untersuchte Urin stammte wiederum von (A.W.).

Die eingesetzte "Uropepsinogen"-Menge entsprach

2,50 mg ± 0,13 mg Schweinepepsinogen.

Versuchsbedingungen:

Lösungsmittel des Harnkonzentrates	0,1M Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6
Ionenaustauscher	DEAE-Sephadex A 25 Fine Anion Exchanger Lot. Nr. To 8870 F
Säulendimensionen	Durchmesser: 2 cm Höhe : 18 cm
Säulentemperatur	+5° C
Fraktionierung	Radi Rac-Fraktionssammler, Zeitschaltung
Volumen der Einzelfraktionen	3,2 ml
Elutionsgeschwindigkeit	0,32 ml
Zahl der Fraktionen pro Stunde	6
Elutionssystem	Das Mischgefäß enthielt 2 Liter 0,1M Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6, der 0,05 molar an NaCl war. Das Reservoir war mit 1 Liter des gleichen Puffers gefüllt, der 0,25 molar an NaCl war. Dadurch wurde ein kontinuierlicher Anstieg der NaCl-Konzentration von 50 bis 250 mÄq. NaCl erreicht.

Die proteolytische Aktivität wurde bei pH 2,1 gemessen.

Abbildung 11 zeigt einen Ausschnitt des Original-Diagrammes der 2. "Uropepsinogen"-Fraktionierung. Der abgebildete Peak stellt das 2. Aktivitätsmaximum dar. Das vollständige Diagramm ist in Abbildung 12 wiedergegeben.

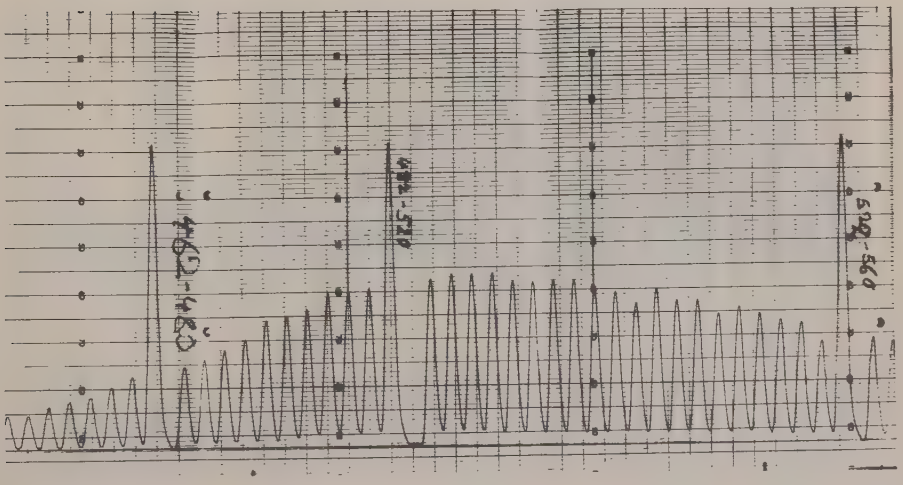


Abbildung 11: 1. Teil des 2. Aktivitätsmaximum im Original-Diagramm der 2. "Uropepsinogen"-Fraktionierung.

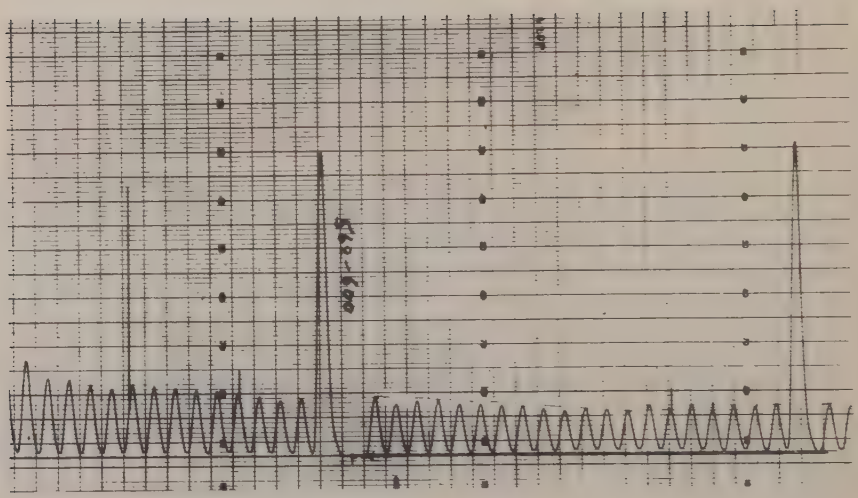


Abbildung 11: 2. Teil des 2. Aktivitätsmaximum im Original-Diagramm der 2. "Uropepsinogen"-Fraktionierung.

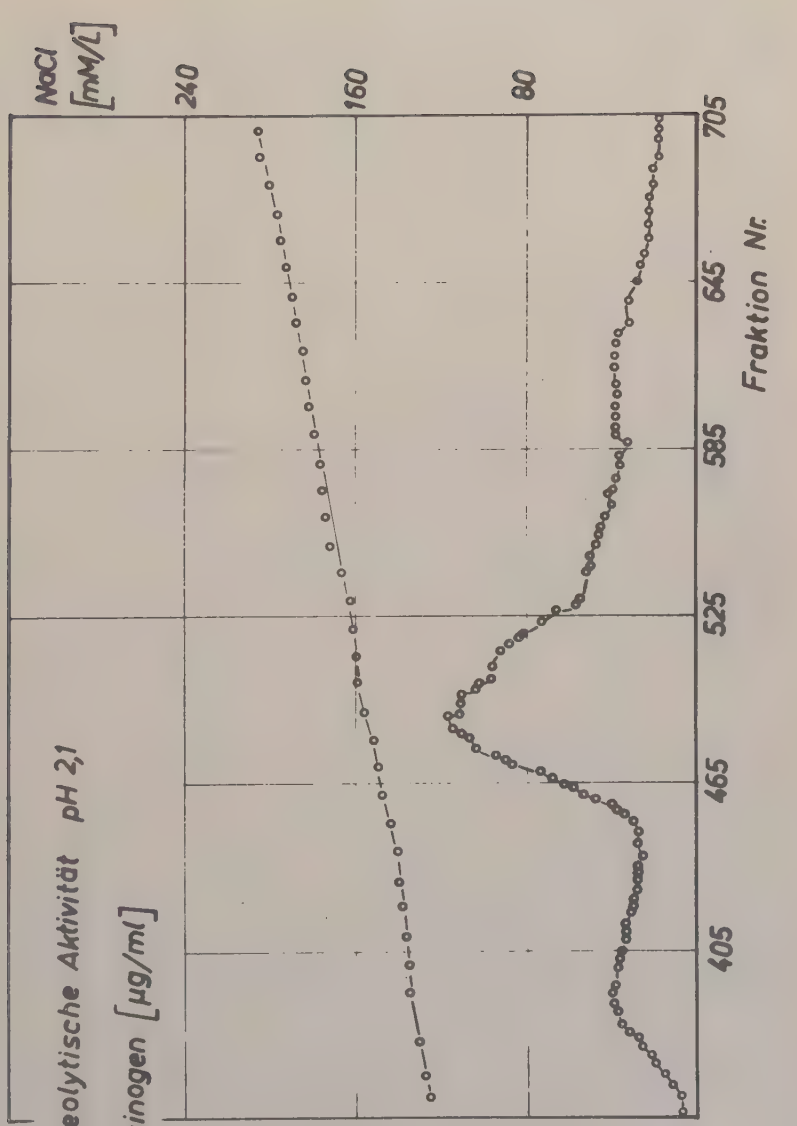


Abbildung 12: Legende siehe Seite 85.

Abbildung 12: 2. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes. Linke Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen. Rechte Ordinate: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/L. Abszisse: Fraktion Nr.

Beschreibung und Diskussion des Diagrammes der 2. "Uropepsinogen"-Fraktionierung:

Das Diagramm der zweiten hier durchgeführten "Uropepsinogen"-Fraktionierung zeigt zwei deutlich voneinander getrennte Maxima proteolytischer Aktivität. Ein drittes Maximum deutet sich an zwischen den Fraktionen 530 und 650. Um die Trennschärfe der elutionschromatographischen Analyse weiter zu verbessern, wurden in den folgenden Fraktionierungen das Fraktionsvolumen durch Herabsetzung der Elutionsgeschwindigkeit weiter verringert.

Abbildung 13 zeigt die Folge des Auftretens der einzelnen "Uropepsinogen"-Komponenten derselben Fraktionierung in Abhängigkeit von den NaCl-Konzentrationen des Elutions-Puffers, die ihre Ablösung vom Ionenaustauscher bewirkten.

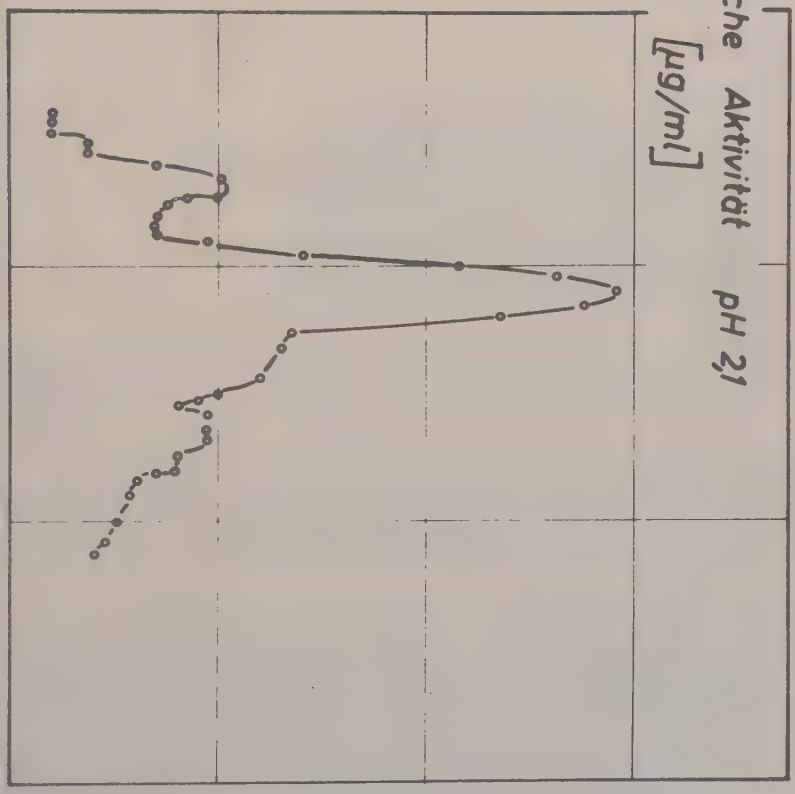


Abbildung 13: Legende siehe Seite 87.

Abbildung 13: 2. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes. Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen. Abszisse: NaCl-Konzentrationen der Eluatfraktionen in mM/L.

Die zu den Maxima der einzelnen Proenzymfraktionen gehörenden NaCl-Konzentrationen:

Maximum der ersten Proenzymfraktion: 135 mM/L.

Maximum der zweiten Proenzymfraktion: 155 mM/L.

Wiedergewinnung an proteolytischer Aktivität: 52 %.

3. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes.

Proband: Der untersuchte Urin stammte von einem gesunden, 25 Jahre alten Kandidaten der Medizin (H.T.).

Die eingesetzte "Uropepsinogen"-Menge entsprach 1,39 mg ± 0,07 mg Schweinepepsinogen.

Versuchsbedingungen:

Lösungsmittel des Harnkonzentrates	0,1M Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6
Tonenaustauscher	DEAE-Sephadex A 25 Fine Anion Exchanger Lot. Nr. To 8870 F
Säulendimensionen	Durchmesser: 2 cm Höhe : 17 cm
Säulentemperatur	+5° C

Fraktionierung	Radi Rac-Fraktionssammler, Zeitschaltung
Volumen der Einzelfraktionen	2,7 ml
Elutionsgeschwindigkeit	0,235 ml/Min.[1)]
Zahl der Fraktionen pro Stunde	6
Elutionssystem	Das Mischgefäß enthielt 2 Liter 0,1M Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6, der 0,08 molar an NaCl war. Das Reservoir war mit 2 Liter des gleichen Puffers gefüllt, der 0,28 molar an NaCl war. Dadurch wurde ein kontinuierlicher Anstieg der NaCl-Konzentration des Elutions-Puffers von 80 bis 280 mÄq. erreicht.

Die proteolytische Aktivität wurde bei pH 2,1 und pH 1,5 gemessen.

Die Diagramme der 3. "Uropepsinogen"-Fraktionierung sind in Abbildung 14 und 15 wiedergegeben.

[1)] Die Elutionsgeschwindigkeit ist durch das in dem verwendeten Pumpschlauch pro Minute beförderte Flüssigkeitsvolumen gegeben. Dieses beträt nach Angabe der Herstellerfirma (TECHNICON GmbH, Frakfurt/Main) für den bei diesem Versuch benutzten Schlauch 0,235 ml/Min. $\pm$ 40 %. Mithin überschreitet das gemessene Fraktionsvolumen nicht die angegebene Fehlerbreite.

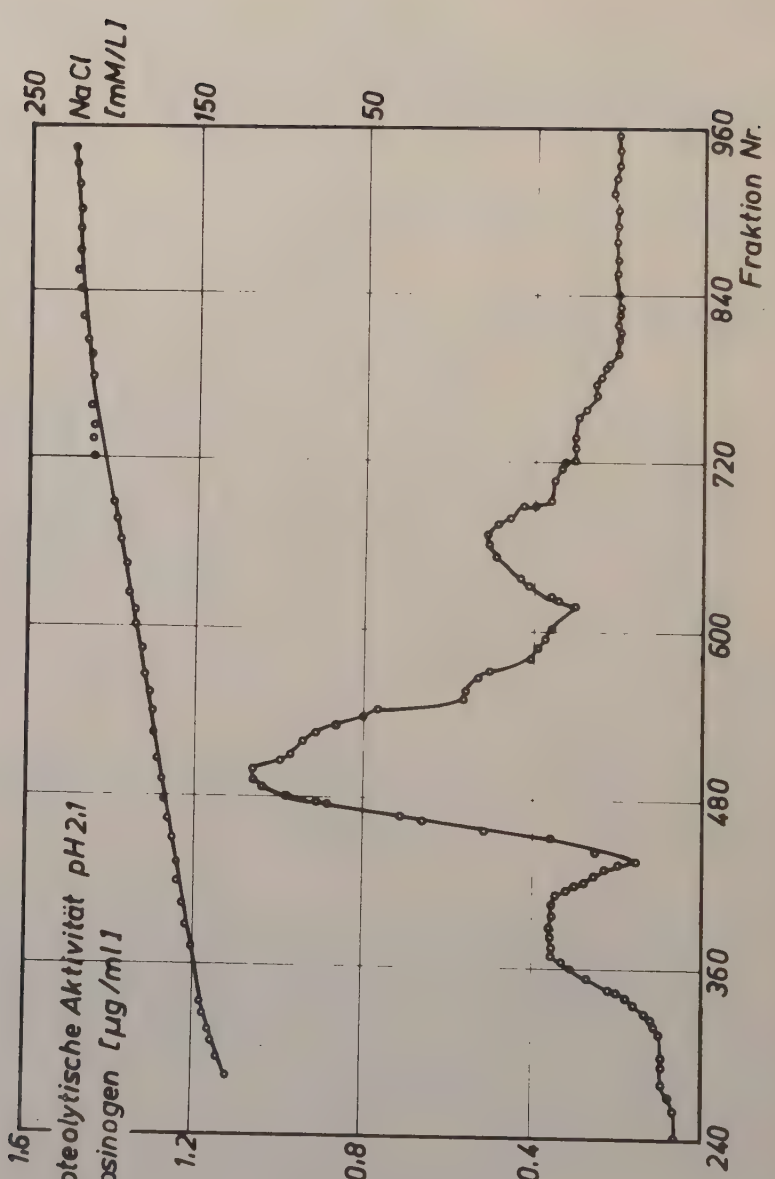


Abbildung 14: Legende siehe Seite 90.

Abbildung 14: 3. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes. (Messung der Enzymaktivität bei pH 2,1). Linke Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen. Rechte Ordinate: NaCl-Konzentrationen der Eluatfraktionen in mM/L. Abszisse: Fraktion Nr.

Abbildung 15: 3. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes. (Messung der Enzymaktivität bei pH 1,5). Linke Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen. Rechte Ordinate: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/L. Abszisse: Fraktion Nr.

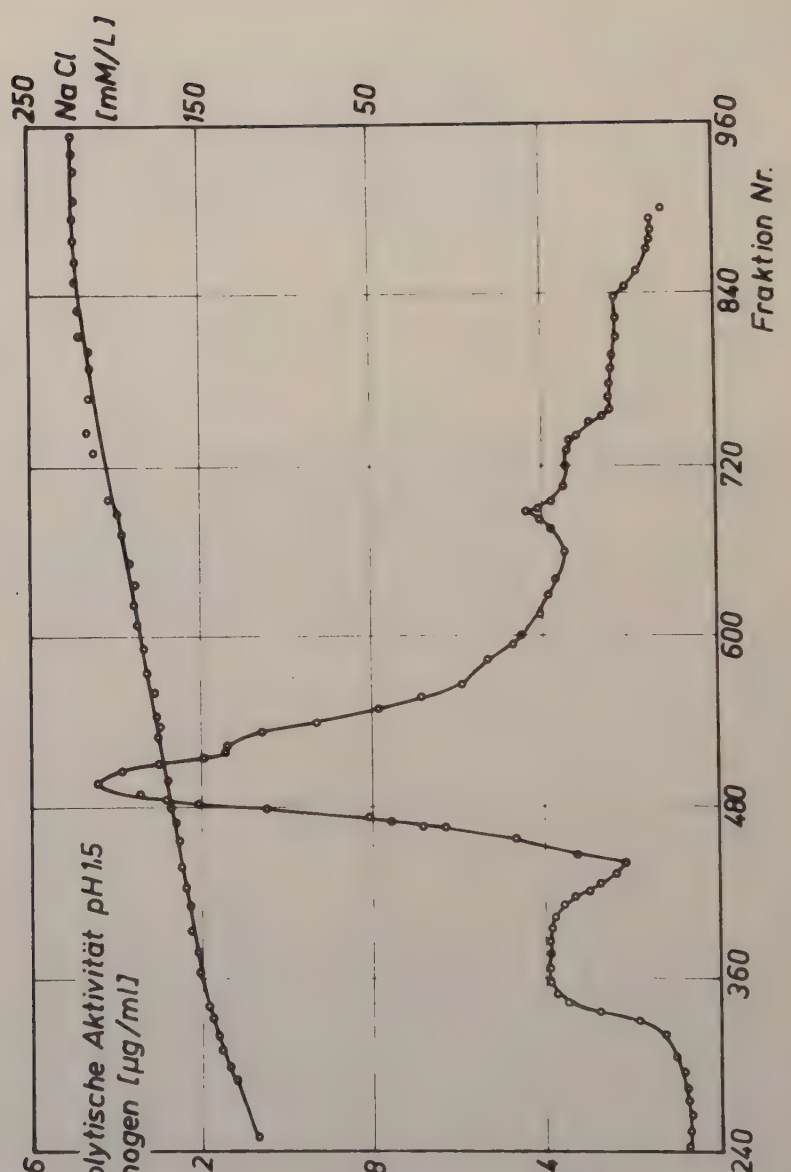


Abbildung 15: Legende siehe Seite 90.

Beschreibung und Diskussion der Diagramme der 3. "Uropepsinogen"-Fraktionierung:

Die in den Abbildungen 14 und 15 wiedergegebenen Diagramme zeigen drei deutlich voneinander getrennte Maxima proteolytischer Aktivität. Auffallend ist die größere Aktivität der 2. "Uropepsinogen"-Komponente bei pH 1,5. Dieser Befund konnte jedoch durch die folgenden säulenchromatographischen Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Die beiden Schultern im Verlauf des absteigenden Schenkels des 2. Peaks lassen auf das Vorhandensein zweier weiterer proteolytisch aktiver Komponenten schließen. Ihr Nachweis kann nur durch Rechromatographie des 2. Aktivitätsmaximums erbracht werden.

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen die Folge des Auftretens der einzelnen "Uropepsinogen"-Komponenten derselben Fraktionierung in Abhängigkeit von den NaCl-Konzentrationen des Elutions-Puffers, die ihre Ablösung vom Ionenaustauscher bewirkten.

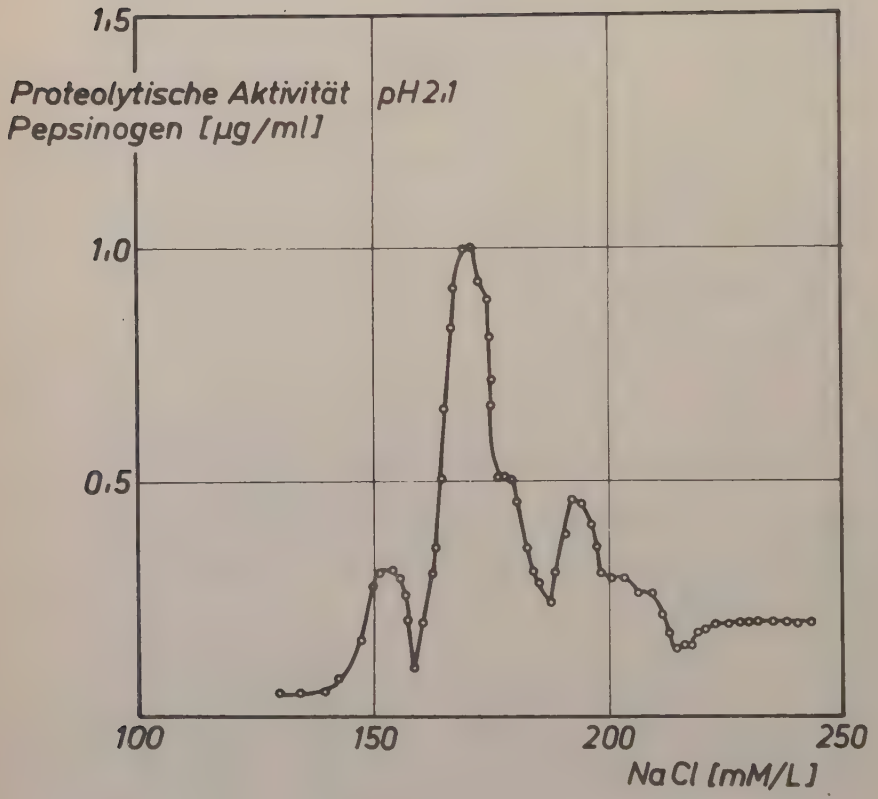


Abbildung 16: Legende siehe Seite 94.

Abbildung 16: 3. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes. (Messung der Enzymaktivität bei pH 2,1). Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen. Abszisse: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/L.

Abbildung 17: 3. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes. (Messung der Enzymaktivität bei pH 1,5). Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen. Abszisse: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/L.

Die zu den Maxima der einzelnen Proenzymfraktionen gehörenden NaCl-Konzentrationen:

Maximum der 1. Proenzymfraktion: 158 mM/L.

Maximum der 2. Proenzymfraktion: 176 mM/L.

Maximum der 3. Proenzymfraktion: 196 mM/L.

Wiedergewinnung an proteolytischer Aktivität: 60 %.

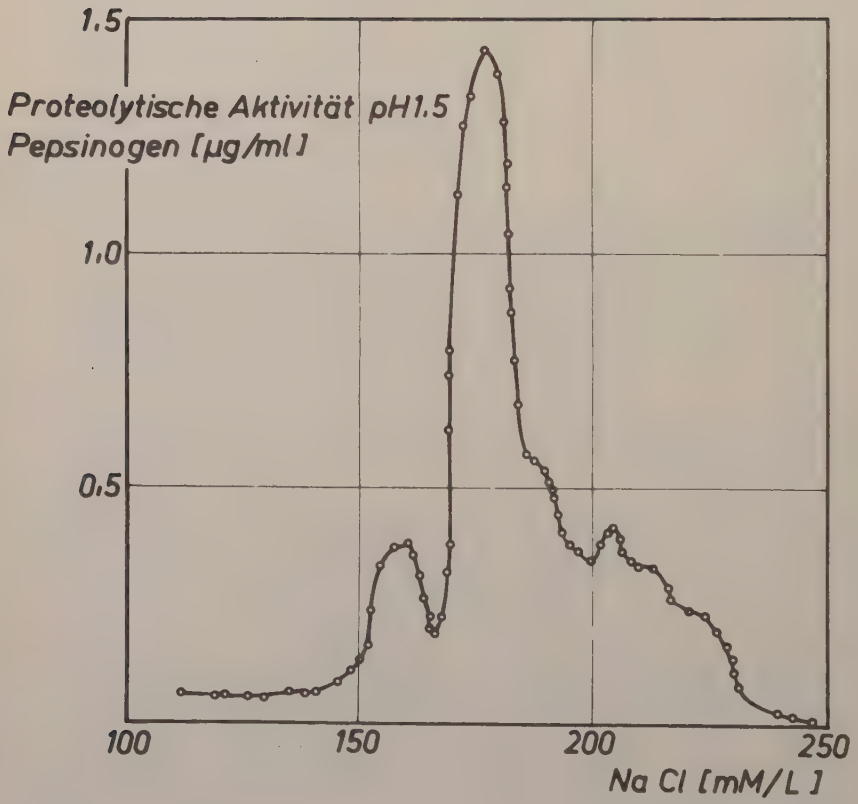


Abbildung 17: Legende siehe Seite 94.

4. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes.

Proband: Der untersuchte Urin stammte von einem gesunden, 25 Jahre alten Kandidaten der Medizin (H.T.).

Die eingesetzte "Uropepsinogen"-Menge entsprach 2,0 mg ± 0,1 mg Schweinepepsinogen.

Versuchsbedingungen:

Lösungsmittel der Harnkonzentrate	0,1M Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6
Ionenaustauscher	DEAE-Sephadex A 25 Fine Anion Exchanger Lot. Nr. To 8870 F
Säulendimensionen	Durchmesser: 2 cm Höhe : 17 cm
Säulentemperatur	+5° C
Fraktionierung	Radi Rac-Fraktionssammler, Zeitschaltung
Volumen der einzelnen Fraktionen	2,4 ml
Elutionsgeschwindigkeit	0,235 ml/Min.
Zahl der Fraktionen pro Stunde	6

Das Elutionssystem — Das Mischgefäß enthielt 2 Liter 0,1M Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6, der 0,08 molar an NaCl war. Das Reservoir war mit 2 Liter des gleichen Puffers gefüllt, der 0,28 molar an NaCl war. Nach Verbrauch des Elutions-Puffers wurden das Mischgefäß und das Reservoir erneut mit jeweils 2 Liter des üblichen Puffers gefüllt. Die NaCl-Konzentration im Mischgefäß: 0,28M/L, im Reservoir: 0,32M/L. Hierdurch erreichte man einen weiteren Anstieg der NaCl-Konzentration um das Vorhandensein weiterer proteolytisch aktiver Komponenten mit stärkerer Bindung an den Ionenaustauscher ausschließen zu können.

Die proteolytische Aktivität wurde bei pH 2,1 und 1,5 gemessen.

Die Chromatogramme der 3. "Uropepsinogen"-Fraktionierung sind in den Abbildungen 18 und 19 wiedergegeben.

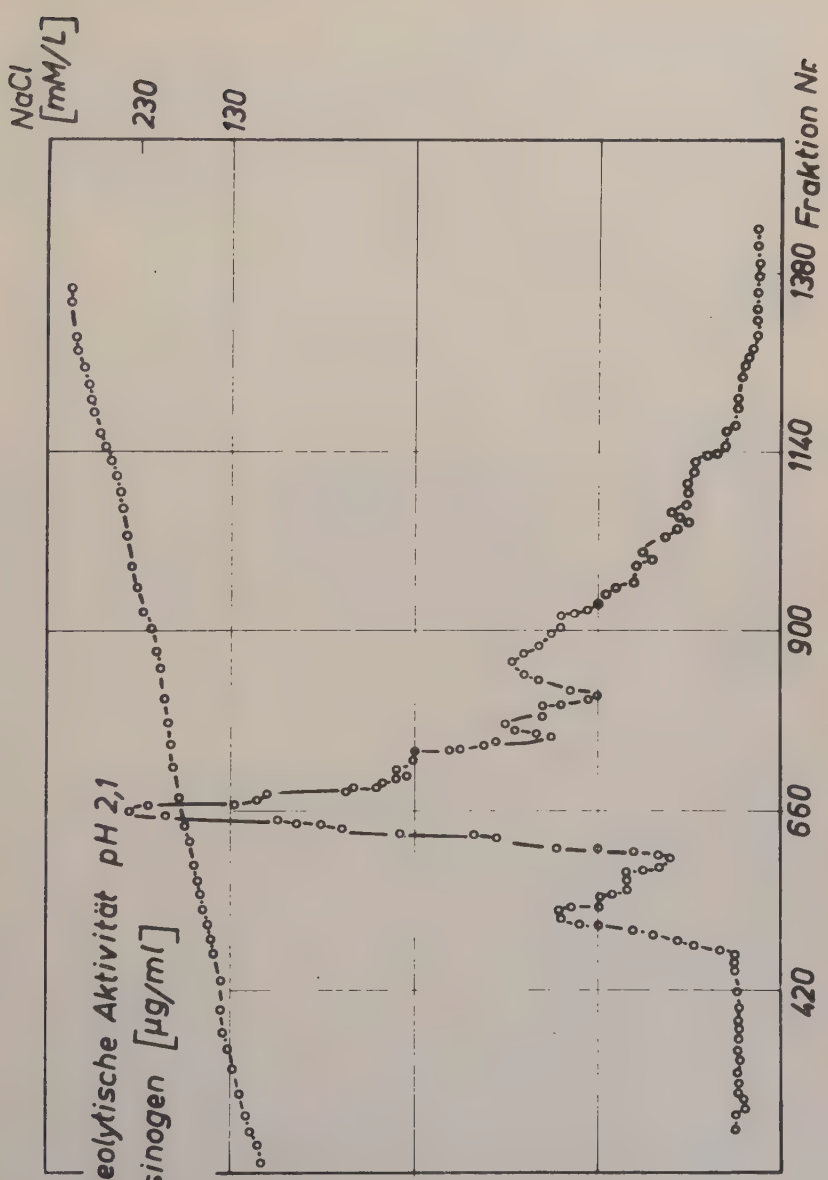


Abbildung 18: Legende siehe Seite 99.

Abbildung 18: 4. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes (Messung der Enzymaktivität bei pH 2,1). Linke Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen. Rechte Ordinate: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/L. Abszisse: Fraktion Nr.

Abbildung 19: 4. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes (Messung der Enzymaktivität bei pH 1,5). Linke Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen. Rechte Ordinate: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/L. Abszisse: Fraktion Nr.

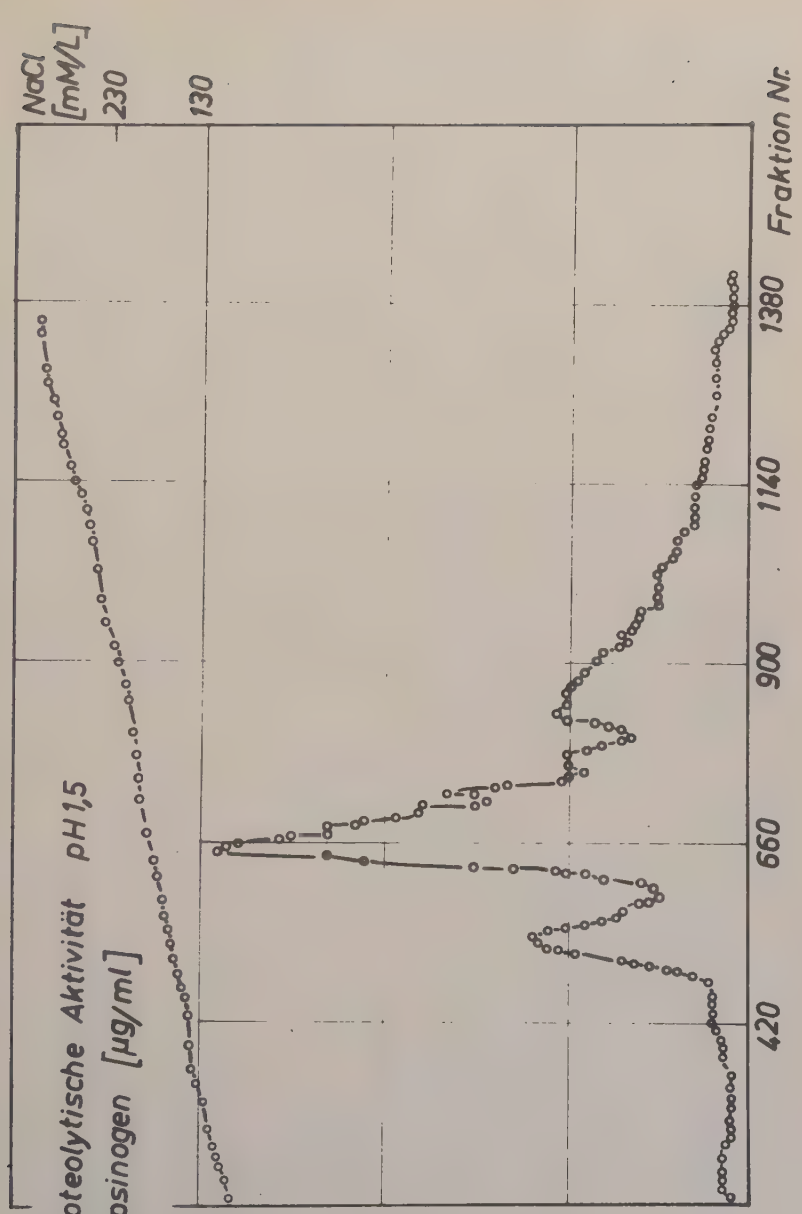


Abbildung 19: Legende siehe Seite 99.

Beschreibung und Diskussion der Chromatogramme der 4. "Uropepsinogen"-Fraktionierung:

Die in den Abbildungen 18 und 19 wiedergegebenen Chromatogramme zeigen wieder drei deutlich voneinander getrennte Maxima proteolytischer Aktivität. Die Stufen im absteigenden Schenkel des zweiten proteolytischen Aktivitätsmaximums geben auch bei dieser Fraktionierung den Hinweis einer eventuellen Uneinheitlichkeit der zweiten "Uropepsinogen"-Komponente.

Abbildung 20 und 21 zeigen die Folge des Auftretens der einzelnen "Uropepsinogen"-Komponenten derselben Fraktionierung in Abhängigkeit von den NaCl-Konzentrationen des Elutions-Puffers, die ihre Ablösung vom Ionenaustauscher bewirkten.

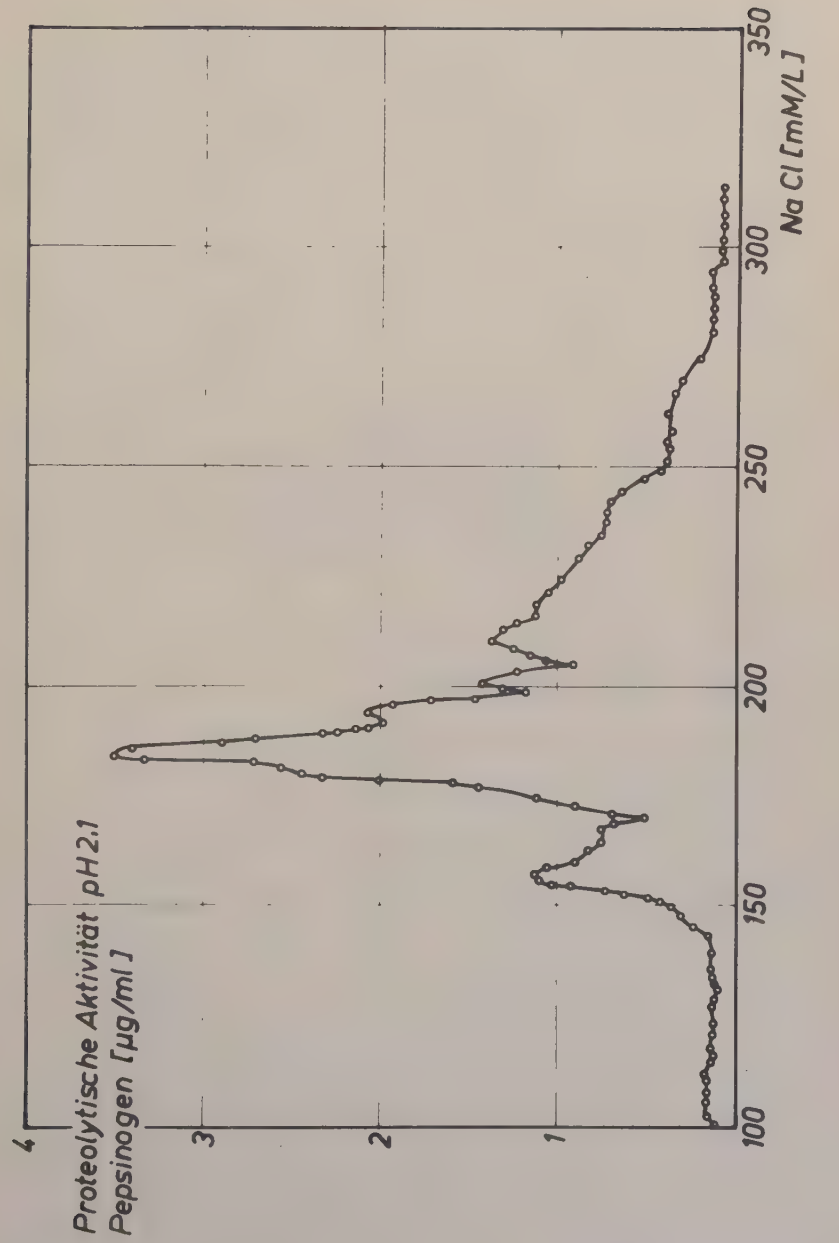


Abbildung 20: Legende siehe Seite 103.

Abbildung 20: 4. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes (Messung der Enzymaktivität bei pH 2,1). Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen. Abszisse: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/L.

Abbildung 21: 4. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes (Messung des Enzymaktivität bei pH 1,5). Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen. Abszisse: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/L.

Die zu den Maxima der einzelnen Proenzymfraktionen gehörenden NaCl-Konzentrationen:

Maximum der 1. Proenzymfraktion: 160 mM/L.

Maximum der 2. Proenzymfraktion: 184 mM/L.

Maximum der 3. Proenzymfraktion: 208 mM/L.

Wiedergewinnung an proteolytischer Aktivität: 94 %.

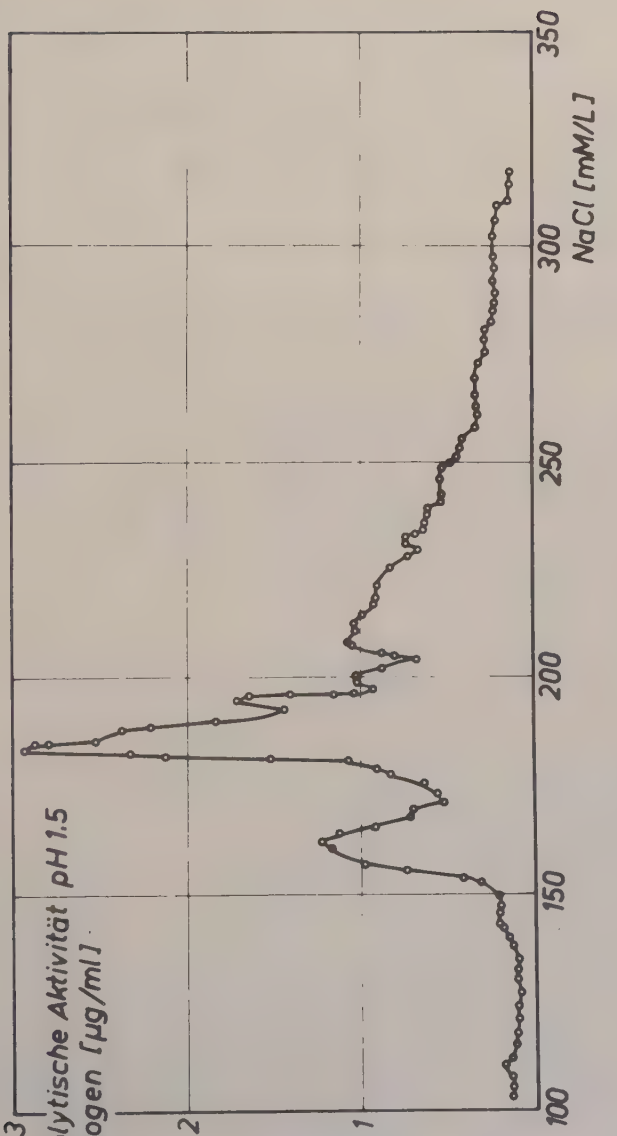


Abbildung 21: Legende siehe Seite 103.

5. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes.

Proband: Der untersuchte Urin stammte von einem gesunden, 25 Jahre alten Kandidaten der Medizin (H.T.).

Versuchsbedingungen:

Lösungsmittel der Harnkonzentrate	0,1M Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6
Ionenaustauscher	DEAE-Sephadex A 25 Fine Anion Exchanger
Säulendimensionen	Durchmesser: 2 cm Höhe : 13,5 cm
Säulentemperatur	+5° C
Fraktionierung	Radi Rac-Fraktionssammler, Zeitschaltung
Volumen der einzelnen Fraktionen	2,2 ml
Elutionsgeschwindigkeit	0,235 ml/Min.
Zahl der Fraktionen pro Stunde	6
Das Elutionssystem	Das Mischgefäß enthielt 2 Liter 0,1M Na-Acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6, der 0,08 molar an NaCl war. Das Reservoir war mit 2 Litern des gleichen Puffers gefüllt, der 0,28 molar an NaCl war.

Die proteolytische Aktivität wurde bei pH 2,1 und 1,5 gemessen.

Die Chromatogramme der 5. "Uropepsinogen"-Fraktionierung sind in den Abbildungen 22 und 23 wiedergegeben.

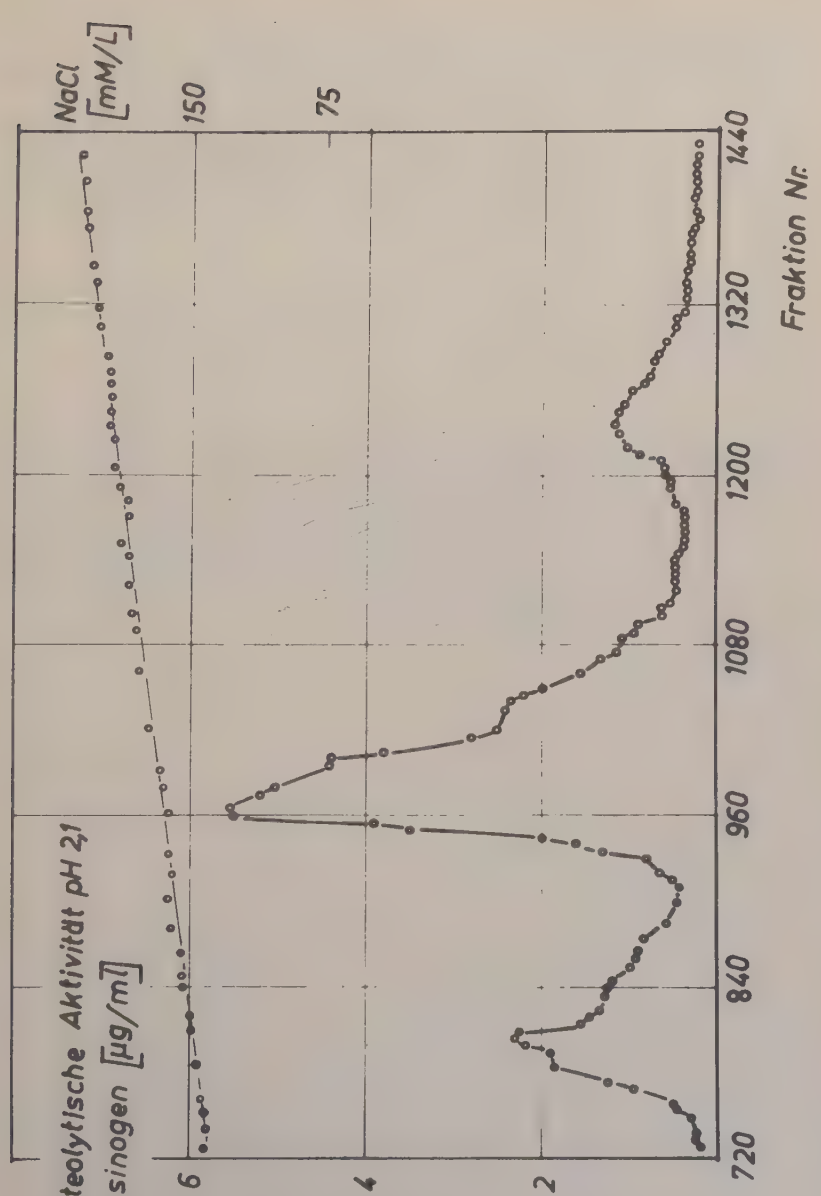


Abbildung 22: Legende siehe Seite 107.

Abbildung 22: 5. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes (Messung der Enzymaktivität bei pH 2,1). Linke Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen. Rechte Ordinate: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/L. Abszisse: Fraktion Nr.

Abbildung 23: 5. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes (Messung der Enzymaktivität bei pH 1,5). Linke Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen. Rechte Ordinate: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/L. Abszisse: Fraktion Nr.

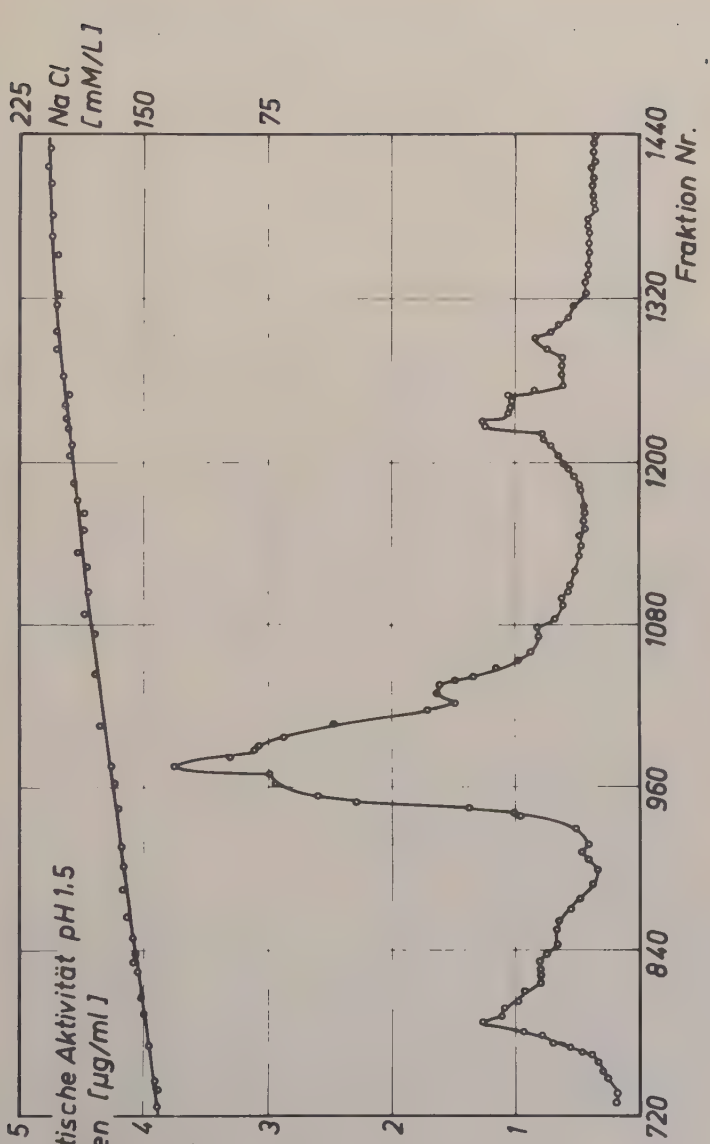


Abbildung 23: Legende siehe Seite 107.

Beschreibung und Diskussion der Chromatogramme der 5. "Uropepsinogen"-Fraktionierung:

Die in den Abbildungen 22 und 23 wiedergegebenen Chromatogramme zeigen wieder drei deutlich voneinander getrennte Maxima proteolytischer Aktivität. Auch hier weist der absteigende Schenkel des zweiten Aktivitätsmaximums wie in den vorhergehenden Fraktionierungen zwei Stufen auf. Dies macht die nähere Untersuchung der zweiten "Uropepsinogen"-Komponente durch Rechromatographie erforderlich.

Abbildung 24 und 25 zeigen die Folge des Auftretens der einzelnen "Uropepsinogen"-Komponenten derselben Fraktionierung in Abhängigkeit von den NaCl-Konzentrationen des Elutions-Puffers, die ihre Ablösung vom Ionenaustauscher bewirkten.

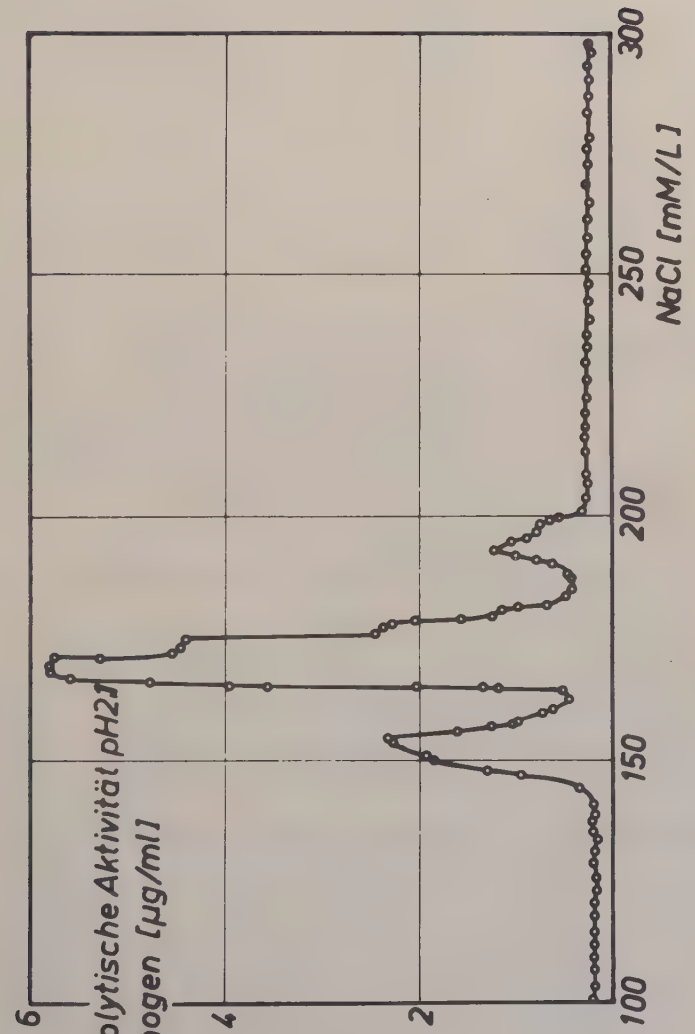


Abbildung 24: Legende siehe Seite 111.

Abbildung 24: 5. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes (Messung der Enzymaktivität bei pH 2,1). Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen. Abszisse: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/L.

Abbildung 25: 5. Fraktionierung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes(Messung der Enzymaktivität bei pH 1,5). Ordinate: Proteolytische Aktivität in µg Äquivalenten Schweinepepsinogen. Abszisse: NaCl-Konzentration der Eluatfraktionen in mM/L.

Die zu den Maxima der einzelnen Proenzymfraktionen gehörenden NaCl-Konzentrationen:

Maximum der 1. Proenzymfraktion: 150 mM/L.

Maximum der 2. Proenzymfraktion: 170 mM/L.

Maximum der 3. Proenzymfraktion: 192 mM/L.

Wiedergewinnung an proteolytischer Aktivität 83 %.

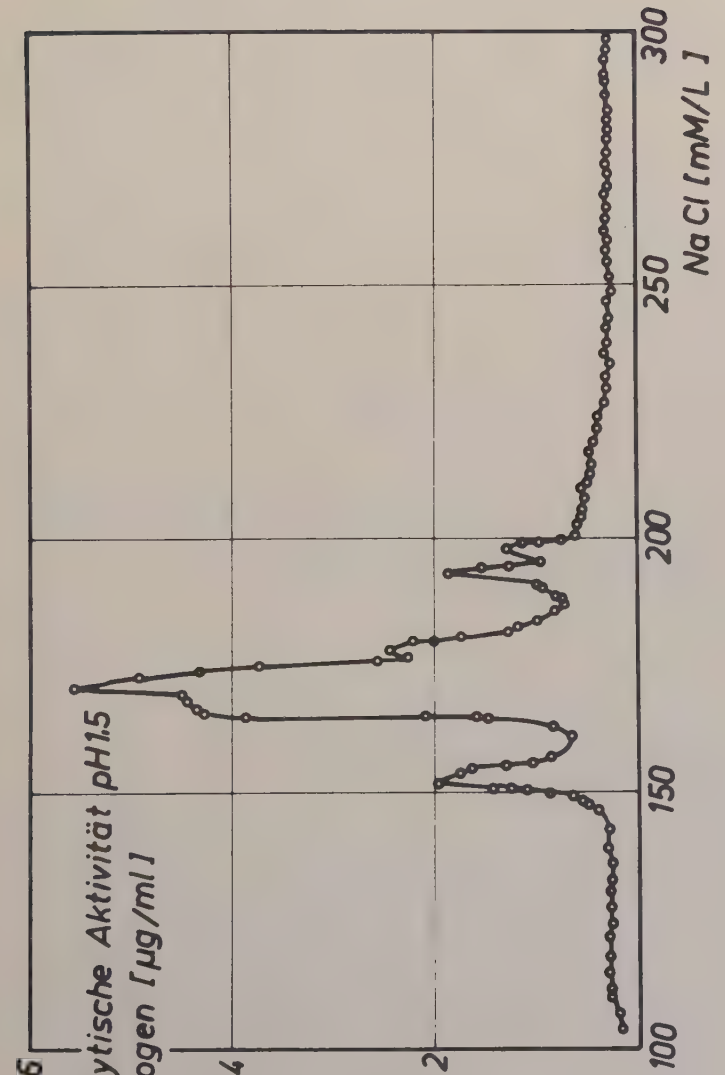


Abbildung 25: Legende siehe Seite 111.

V. ZUSAMMENFASSUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE

Die hier vorgenommenen säulenchromatographischen Untersuchungen zeigen, daß die bisher summarisch als "Uropepsinogen" bezeichnete inaktive Vorstufe der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes aus mehreren Proenzymen besteht. Diese konnten mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie weitgehend voneinander getrennt werden. Die hier vorgelegten Chromatogramme lassen mindestens drei saure proteolytische Proenzymfraktionen im menschlichen Harn erkennen. Eine in allen Chromatogrammen erkennbare Schulter im absteigenden Teil der zweiten Proenzymfraktion läßt vermuten, daß hier noch eine weitere Proenzymfraktion vorliegen könnte.

Die drei deutlich voneinander getrennten Proenzymfraktionen wurden von NaCl-Konzentrationen vom Ionenaustauscher abgelöst, die zwischen 0,125 und 0,230 M/L lagen. Die zur Elution führenden Kochsalzkonzentrationen erwiesen sich für jede der Proenzymfraktionen als weitgehend konstant. Mithin können diese durch ihre Elutionsbedingungen charakterisiert werden.

In Tabelle 13 sind die gefundenen Proenzymfraktionen entsprechend der Reihenfolge ihres Auftretens im Chromatogramm angeführt und durch die NaCl-Konzentrationen charakterisiert, die ihre Elution bewirken.

1. Proenzymfraktion:

	Die zu dem Maximum der 1. Proenzymfraktion gehörende NaCl-Konzentration	Mittelwert und maximale Abweichung in mM/L und % des Mittelwertes
2. Fraktionierung	135 mM/L	
3. Fraktionierung	158 mM/L	
4. Fraktionierung	160 mM/L	150 ± 15 mM/L (10 %)
5. Fraktionierung	150 mM/L	

2. Proenzymfraktion:

	Die zu dem Maximum der 2. Proenzymfraktion gehörende NaCl-Konzentration	Mittelwert und maximale Abweichung in mM/L und % des Mittelwertes
2. Fraktionierung	155 mM/L	
3. Fraktionierung	176 mM/L	
4. Fraktionierung	184 mM/L	171 ± 16 mM/L (9,4 %)
5. Fraktionierung	170 mM/L	

3. Proenzymfraktion:

	Die zu dem Maximum der 3. Proenzymfraktion gehörende NaCl-Konzentration	Mittelwert und maximale Abweichung in mM/L und % des Mittelwertes
2. Fraktionierung		
3. Fraktionierung	196 mM/L	
4. Fraktionierung	208 mM/L	198 ± 10 mM/L (5,0 %)
5. Fraktionierung	192 mM/L	

Tabelle 13: NaCl-Konzentrationen, welche die Elution der gefundenen Proenzymfraktionen bewirken.

In der ersten und zweiten "Uropepsinogen"-Fraktionierung wurden etwa 50 %, in den folgenden 60 %, 90 % und 80 % der eingesetzten Enzymaktivität wiedergefunden. Die relativ geringe Wiedergewinnung an proteolytischer Aktivität in den ersten der hier durchgeführten säulenchromatographischen Untersuchungen beruht wahrscheinlich auf einer vorzeitigen Beendigung der Fraktionierungen. Es ist anzunehmen, daß ein Teil der eingesetzten Enzymaktivität nicht mehr vom Ionenaustauscher abgelöst wurde, da ein Rest an Puffer im Elutionssystem zurückblieb. Hierfür spricht die nahezu vollständige Wiedergewinnung an proteolytischer Aktivität in der vierten und fünften "Uropepsinogen"-Fraktionierung, die erst beendet wurden, nachdem die gesamte Menge des verwendeten Elutions-Puffers die Säule passiert hatte bzw. nachdem die Fraktionierung mit einem Puffer weitergeführt worden war, dessen NaCl-Gehalt von der sonst verwendeten Endkonzentration von 280 mM/L noch bis 320 mM/L anstieg.

Durch mehrmaliges Auswerten derselben Originalchromatogramme konnte nachgewiesen werden, daß der systematische Fehler der Aktivitätsmessung oberhalb einer Aktivität von einem μg Äquivalente Schweinepepsinogen 5 % nicht übersteigt.

VI. DISKUSSION

Die hier dargestellten Ergebnisse der chromatographischen Fraktionierung des "Uropepsinogens" beweisen seine Uneinheitlichkeit. Da die Bedingungen der vorliegenden Untersuchung mit den Untersuchungsbedingungen von SEIJFFERS u.Mitarb. annähernd übereinstimmen, ist es möglich, die Resultate beider Untersuchungen zu vergleichen. SEIJFFERS u.Mitarb. verwendeten als Ionenaustauscher DEAE-Cellulose, die vorliegende Untersuchung DEAE-Sephadex. Beide Austauscher besitzen gleiche funktionelle Gruppen; ihre Matrices enthalten als Monomeres Glucose, die in der Cellulose in einer 1,4 ß glucosidischen und im Dextrangel vorwiegend in einer 1,6 glucosidischen Bindung vorliegt. Der hydrophile Charakter ist durch die Hydroxylgruppen des Monomeren bedingt. Nach dem Gesagten ist zu erwarten, daß die NaCl-Konzentrationen, die zur Elution der von SEIJFFERS gefundenen Pepsinogene führten, im gleichen Bereich liegen wie die Kochsalzkonzentrationen, welche die Ablösung der in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesenen Proenzymfraktionen bewirkten.

In der Tabelle 14 sind diese NaCl-Konzentrationen gegenübergestellt:

Pepsinogene nach SEIJFFERS	NaCl-Konz.	Proenzymfraktionen	NaCl-Konz.
Pepsinogen II	128 mM/L	1. Proenzymfraktion	150 ± 15 mM/L
Pepsinogen III "early"	132 mM/L	2. Proenzymfraktion	170 ± 17 mM/L
Pepsinogen III "late"	134 mM/L	3. Proenzymfraktion	198 ± 10 mM/L

Tabelle 14: NaCl-Konzentrationen, bei denen die von SEIJFFERS im Harn nachgewiesenen Pepsinogene und die in der vorliegenden Untersuchung gefundenen Proenzymfraktionen eluiert wurden.
Der von SEIJFFERS verwendete Elutions-Puffer hatte einen pH von 5,3, der in den hier vorliegenden Untersuchungen benutzte Elutions-Puffer einen pH von 5,6.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, liegen die zur Elution benötigten NaCl-Konzentrationen im gleichen Konzentrationsbereich. Unter Berücksichtigung der Differenz der pH-Werte läßt sich schließen, daß bei Verwendung von DEAE-Cellulose bzw. DEAE-Sephadex bei pH-Werten über 5,6 eine weitergehende Auflösung des Chromatogrammes zu erwarten ist.

Die chromatographische Uneinheitlichkeit des menschlichen "Uropepsinogens" steht in Übereinstimmung mit der Feststellung, daß auch das Magenpepsinogen des Menschen chromatographisch nicht einheitlich ist. Ebenso ist das Magenpepsinogen des Schweines chromatographisch nicht einheitlich. Hingegen haben die bisher untersuchten Pepsinogene von Mensch und Schwein die gleiche Molekülgröße wie sich aus der Zusammenstellung der Molekulargewichte und der zugehörigen Äquivalentradien in Tabelle 15 ergibt.

Untersucher	Pepsinogene	M	r . 10^{-8} cm
RYLE u. PORTER	Pepsinogen B	40500 (S.D.)	22,4 . 10^{-8} cm
RYLE u. PORTER	Pepsinogen C	42000 (S.D.)	22,7 . 10^{-8} cm
HERRIOTT	Pepsinogen	42000 (osm.) $\pm$3000	23 . 10^{-8} cm
SIEWERS	Uropepsinogen	42000 (G.C.)	23 . 10^{-8} cm

Tabelle 15: Die Molekulargewichte der einzelnen Pepsinogene und die dazugehörigen Äquivalentradien.

Erklärung der in der Tabelle angegebenen Symbole:

M : Molekulargewichte

S.D.: Sedimentations-Diffusionsmessung

osm : osmotische Messung

G.C.: Abschätzung des Molekulargewichtes mit Hilfe der Gelchromatographie

Die in der 4. Spalte der Tabelle angegebenen Äquivalentradien wurden mit Hilfe folgender Gleichung errechnet:

$$r = \sqrt[3]{\frac{3\,M\,\bar{V}}{4\,N_1}}$$

M : Molekulargewicht

$\bar{V}$: partielles spezifisches Volumen
(dieser Wert wurde mit 0,73 angenommen).

N_1: Loschmidt'sche Zahl

Die Gleichung geht von der Voraussetzung aus, daß es erlaubt ist, die molekulare Gestalt der einzelnen Pepsinogene durch eine Äquivalentkugel zu ersetzen, eine Annahme, die im allgemeinen bei kompakten Proteinmolekülen zulässig ist (14).

Bei gleicher molekularer Größe müssen sich also die chromatographisch differenzierbaren Pepsinogene einer Spezies

durch ihr Dissoziationsverhalten unterscheiden.
Diese Annahme kann durch andere Untersuchungsmethoden unterstützt werden. Den Untersuchungen von KUSHNER, der menschliche Pepsinogene mit Hilfe der Agargel-Elektrophorese trennte, kann entnommen werden, daß die Pepsinogene der menschlichen Magenschleimhaut als Anionen verschiedener elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit vorliegen. Die Agargel-Elektrophorese trennt nach dem Prinzip der elektrophoretischen Beweglichkeit. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist bei sonst konstanten Versuchsbedingungen proportional der Nettoladung und umgekehrt proportional dem Äquivalentradius eines Proteins. Da den untersuchten Pepsinogenen ein gleicher oder ähnlicher Äquivalentradius zukommt (siehe Tabelle), müssen ihre unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten auf Unterschieden der negativen Ladung beruhen.
Somit führt die Interpretation des säulenchromatographischen sowie die des gelelektrophoretischen Verhaltens zu der Annahme, daß die Pepsinogene Anionen gleicher molekularer Größe aber verschiedener Dissoziationsverhältnisse sind.
Über die das unterschiedliche Dissoziationsverhalten bestimmenden Unterschiede der molekularen Struktur ist nichts bekannt.

VII. A N H A N G

SEIJFFERS u.Mitarb. gaben die Gradientenverläufe ihrer elutionschromatographischen Fraktionierungen nur zum Teil an. Die Gradientenverläufe wurden deshalb in dieser Arbeit nachträglich ermittelt. Dies gestattet den Vergleich der hier durchgeführten Fraktionierungen mit denen von SEIJFFERS.

SEIJFFERS u.Mitarb. geben die NaCl-Konzentrationen an, welche sie zur Füllung der einzelnen Kammern des Varigrads benutzten. Der Varigrad - eine automatisch arbeitende Gradientenmischbatterie - besteht aus neun zylindrischen Kammern, die in Serie geschaltet sind. Die Mischung erfolgt unter ständigem Rühren in den einzelnen Kammern durch hydrostatischen Druckausgleich. Die von SEIJFFERS verwendete Versuchsanordnung erzeugt einen Gradientenverlauf, der nur auf umständliche Weise mathematisch zu erfassen ist. Seine Ermittlung läßt sich leichter auf experimentellem Wege erreichen.

Pikrinsäurekonzentrationen, die den von SEIJFFERS verwendeten Kochsalzkonzentrationen proportional sind, werden entsprechend der von ihm angegebenen Beschickung der einzelnen Kammern eingesetzt. Der Zusammenhang zwischen der Konzentration einer Pikrinsäurelösung und deren Extinktion ist durch das Lambert Beer'sche Gesetz gegeben. Damit sind die Konzentrationen eines Pikrinsäuregradienten in einfacher Weise durch Extinktionsmessungen zu bestimmen. Der Konzentrationsverlauf des Pikrinsäuregradienten, der

analog den Vorschriften von SEIJFFERS hergestellt wurde, entspricht damit dem des von ihm verwendeten NaCl-Gradienten. Die gemessenen Extinktionen der Pikrinsäure lassen sich in Kochsalzkonzentrationen bei Gültigkeit des Lambert Beer'schen Gesetzes angeben. Nun ist der Vergleich der NaCl-Konzentrationen, die an DEAE-Sephadex (vorliegende Arbeit) und an DEAE-Cellulose (SEIJFFERS u.Mitarb.) die Ablösung der einzelnen proteolytischen Komponenten bewirken, möglich.

Ausführung:

Es wurden Pikrinsäurelösungen hergestellt, deren Konzentrationen proportional den von SEIJFFERS angegebenen NaCl-Konzentrationen waren. Die dazu verwendete Pikrinsäure wurde in einem Exsiccator vorgetrocknet. Da die Pikrinsäure nicht bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde, erfolgte die Herstellung der einzelnen Pikrinsäurelösungen aus einer Stammlösung, die = 100 % Verdünnung gesetzt wurde. Sie entspricht der höchsten von SEIJFFERS angegebenen NaCl-Konzentration. Die einzelnen Verdünnungen der Pikrinsäurestammlösung waren proportional den von SEIJFFERS angegebenen übrigen NaCl-Konzentrationen. Nun konnte nach dem oben angegebenen Verfahren der Gradient ermittelt werden.
Die gefundenen Gradientenverläufe sind in den Abbildungen 26 und 27 wiedergegeben.

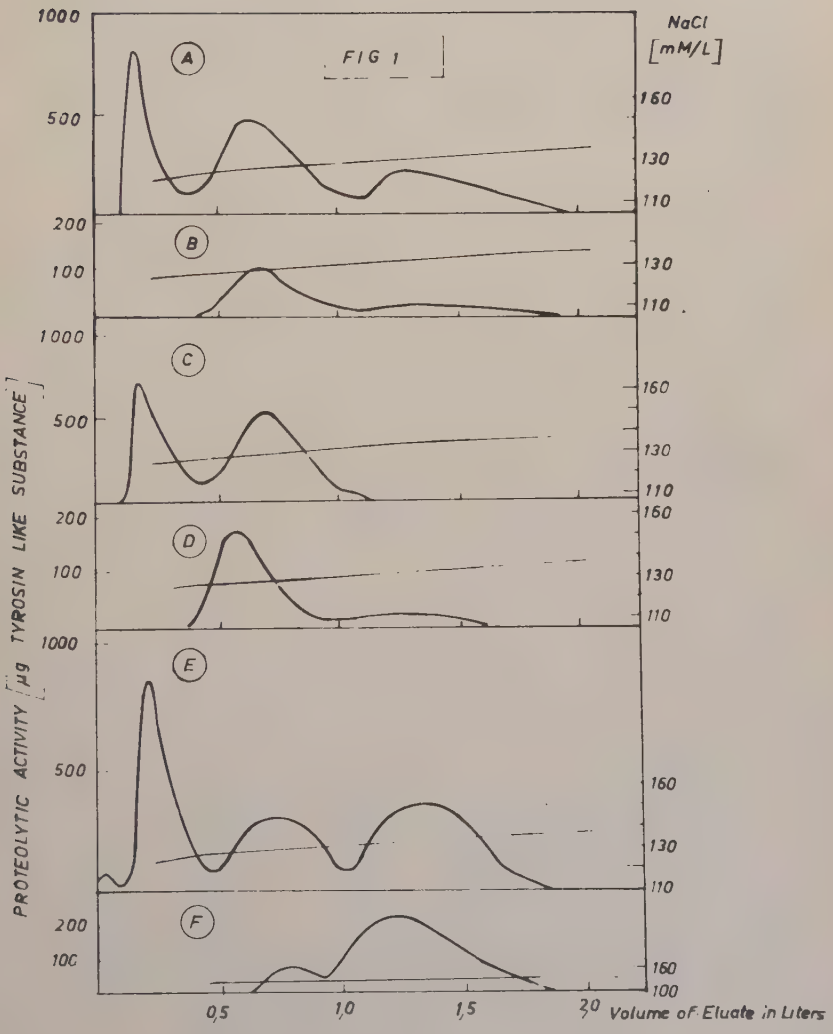


Abbildung 26: Legende siehe Seite 127.

Legende zu den Abbildungen 26 und 27:

Die von SEIJFFERS u.Mitarb. durchgeführten Fraktionierungen der sauren proteolytischen Enzymaktivität aus Magenschleimhautextrakten und Harn. In den Abbildungen 26 und 27 ist der in der oben beschriebenen Weise ermittelte Gradientenverlauf eingezeichnet.
Die ausführlichen Legenden sind auf den Seiten 51 und 52 wiedergegeben.

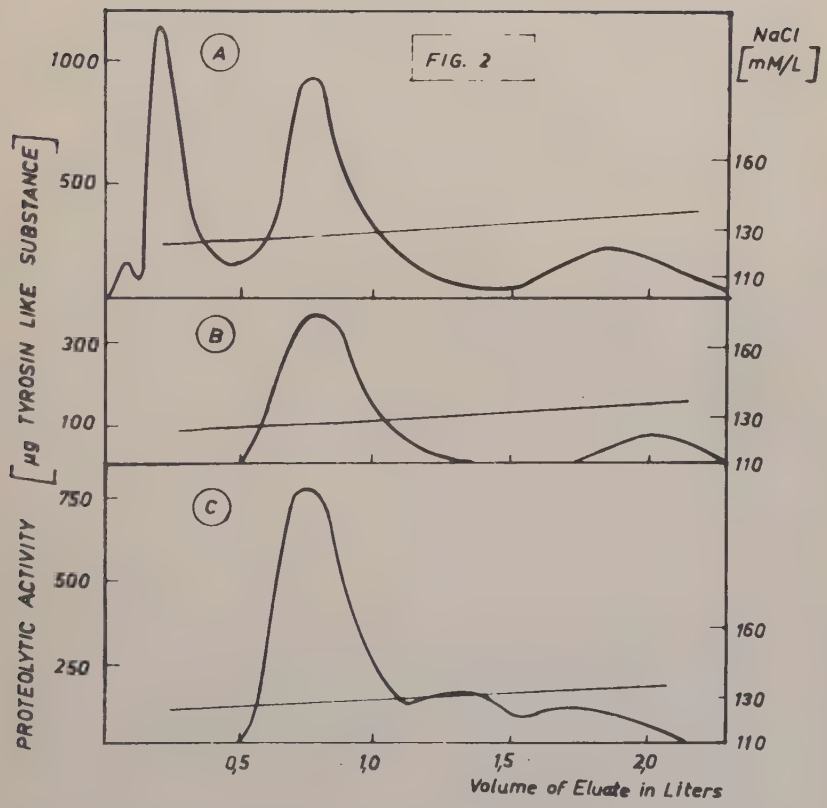


Abbildung 27: Legende siehe Seite 127.

VIII. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. In der vorliegenden Untersuchung wird einleitend der gegenwärtige Stand der Kenntnisse des menschlichen Magenpepsinogens und des "Uropepsinogens" dargestellt.

   Die Methode und Ergebnisse säulenchromatographischer Fraktionierungen der sauren proteolytischen Enzymaktivität der Magenschleimhaut und ihrer auch im Harn ausgeschiedenen inaktiven Vorstufe werden dargestellt und analysiert.

2. Durch die Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sephadex wird gezeigt, daß die im menschlichen Harn vorhandene inaktive Vorstufe der sauren proteolytischen Enzymaktivität ("Uropepsinogen") aus mindestens drei Komponenten besteht, von denen angenommen werden muß, daß sie sich lediglich durch ihr Dissoziationsverhalten unterscheiden.

3. Die Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Befunden, die im Verlauf dieser Untersuchung von SEIJFFERS u.Mitarb. publiziert wurden.

4. Die einschlägige Literatur wurde bis Ende September 1966 berücksichtigt.

IX. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

(1) AITKEN, M.A., GRAY, G.H. and WALTERS, G. — Clin. Scien. 13 (1954) 119

(2) ANSON, M.L. and MIRSKY, A.E. — J. Gen. Physiol. 16 (1932) 5

(3) ANSON, M.L. — J. Gen. Physiol. 22 (1938) 7

(4) BALFOUR, D.C., PRESTON, F.W. and BOLLMAN, J.L. — Gastroenterology 10 (1948) 8

(5) BENDERSKY, J. — Virchow's Arch. pathol. Anat. 121 (1890) 554

(6) BOARDMAN, N.K. and PARTRIDGE, S.M. — Biochem. J. 59 (1955) 543

(7) BROKATE, W. — Inauguraldissertation: Ein automatisiertes Verfahren zur Bestimmung der sauren proteolytischen Enzymaktivität im Harn. Med. Fakultät d. Univ. d. Saarlandes (1966)

(8) von BRÜCKE, E. — Sitzungsbericht Akd. Wissensch., Math.-naturwiss. Klasse 43 (1861) 601

(9) van CALCKAR, R.P. — Arch. ges. Physiol. 148 (1912) 257

(10) FAHEY, J.L., Mc COY, P.F. and GOULIAN, M. — J. clin. Invest. 37 (1958) 2

(11) FALK, F. und KOLIEB, S. — Ztschr. klin. Med. 67 (1909) 157

(12) GEHRIG, F. — Pflüger's Arch. ges. Physiol. 38 (1886) 35 zit. bei RICHTERICH, R., 'Enzympathologie', Springer-Verlag, Berlin Göttingen Heidelberg (1958)

(13) GRAY, S.J., RAMSEY, C.G. and REIFFENSTEIN, R.W. — New. Engl. J. Med. 251 (1954) 835

(14) HENGSTENBERG, J. — Das Makromolekül in Lösungen, Springer-Verlag, Berlin Göttingen Heidelber (1953) 411 - 461

(15) HERRIOTT, J. — J. Gen. Physiol. 21 (1938) 501 zit. in Enzymes 4 (1960) 68

(16) HIRSCHOWITZ, B.I. — Physiol. Rev. 37 (1957) 475

(17) JANOWITZ, H.D. and HOLLANDER, F. — Gastroenterology 17 (1951) 591

(18) KUSHNER, I., RAPP, W. and BURTIN, P. — J. clin. Invest. 43 (1964) 1983

(19) LEPPLA, W., FREIS, A., HOFFSÜMMER, B. und KELLER, H.E. — 3. Symp. Dt. Ges. Nephrol. (1964) Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart

(20) MIRSKY, I.A., FISHER, B. and HARRISON, S.R. — J. Lab. & Clin. Med. 46 (1955) 933

(21) MÜLLER, W.A. — Dtsch. med. Wschr. 84 (1959) 392

(22) NORTHROP, J.H., KUNITZ, M. and HERRIOTT, R.M. — 'Cristalline Enzymes', 2.ed., Columbia Univ.Press (1948), New York

(23) PAPPENHEIMER, J.R. — Klin. Wschr. 33 (1955) 362

(24) PECHSTEIN, H. — Ztschr. Kinderheilkd. 1 (1911) 356 zit. bei BUCHER, G.R. Gastroenterology 8 (1947) 627

(25) PERLMANN, G.E. — Advances in Protein Chem. 10 (1955) 23

(26) PETERSON, E.A. and SOBER, H.A. — Methods in Enzymology 5 (1962) 3

(27) RICHMOND, V., CAPUTTO, R. and WOLF, S. — Arch. Biochim. Biophys. 66 (1957) 155

(28) RICHMOND, V., CAPUTTO, R., TANG, J., TRUCCO, R.E. and WOLF, S. — Biochim. Biophys. Acta 29 (1958) 453

(29) RYLE, A.P. and PORTER, R.R. — Biochem. J. 73 (1959) 75

(30) RYLE, A.P. and PORTER, R.R. — Biochem. J. 75 (1960) 145

(31) RYLE, A.P. and PORTER, R.R. — Biochem. J. 96 (1965) 6

(32) RYLE, A.P. and LEE, D. — Biochem. J. 87 (1963) 44P

(33) RYLE, A.P. — The Heterogenity of the gastric proteinases. Protein Metab., Symp., Glasgow (1963) 25 - 40 (Pub. 1964) (Eng.) Munro, H.N. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd.

(34) SEIJFFERS, M.J., SEGAL, H.L. and MILLER, L.L. — Am. J. Physiol. 205 (1963) 1106

(35) SEIJFFERS, M.J., MILLER, L.L. and SEGAL, H.L. — Biochemistry 3 (1964) 1

(36) SEIJFFERS, M.J., MILLER, L.L. and SEGAL, H.L. — Biochemistry 3 (1964) 1203

(37) SEIJFFERS, M.L., SEGAL, H.L. and MILLER, L.L. — Am. J. Physiol. 205 (1963) 1099

(38) SEIJFFERS, M.J., SEGAL, H.L. and MILLER, L.L. — Am. J. Physiol. 206 (1964) 1106

(39) TANG, J. and TANG, K.J. — J. Biol. Chem. 238 (1963) 606

(40) TANG, J., WOLF, S., CAPUTTO, R. and TRUCCO, R.E. — J. Biol. Chem. 234 (1959) 1174

(41) TURBA, F. — Advances in Enzymology 22 (1960) 417

Herrn Prof. Dr. med. F. D o e n e c k e , Direktor der I. Medizinischen Universitätsklinik, danke ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung, die er mir zuteil werden ließ.

Herrn Privatdozent Dr. med. W. L e p p l a, Oberarzt der I. Medizinischen Universitätsklinik und Herrn Dr. rer. nat. H.E. K e l l e r darf ich meinen aufrichtigen Dank für die wertvolle Hilfe bei der Ausarbeitung und Gestaltung der vorliegenden Arbeit aussprechen.

L e b e n s l a u f

Am 9.10.1939 wurde ich als Sohn des Orchestermusikers Hans Theiß und seiner Ehefrau Christiana, geborene Schelter, in München geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Marktredwitz - Oberfranken (1945 - 1951) erhielt ich meine höhere Schulausbildung am Staatlichen Max-Plank-Gymnasium in Trier. Nach Ablegung der Reifeprüfung (1960) begann ich das Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes. Im Wintersemester 1960/61 bestand ich das Vorphysikum, im Wintersemester 1962/63 das Physikum. Mit Ausnahme des 2. klinischen Semesters, das ich an der Universität München verbrachte, vollzog ich meine medizinische Ausbildung an der Universität des Saarlandes. Hier bestand ich im Sommersemester 1966 das Staatsexamen.

Geschäfts-, Werbe- und Privat-Drucksachen

ROTAPRINT-OFFSET-DRUCKEREI
6602 DUDWEILER
Scheidter Straße 26 Telefon Amt Sulzbach 7 32 84

Spezialgebiet: Druck von Dissertationen